

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

Departamento de Psicobiología



## TESIS DOCTORAL

Lípidos transmisores y condicionamientos inducidos por cocaína

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Jesús Luque Rojas

Directores

Fernando Rodríguez de Fonseca  
Eduardo Blanco Calvo

Madrid, 2012

ISBN: 978-84-606-5451-3

© María Jesús Luque Rojas, 2012

**UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE PSICOLOGÍA  
Departamento de Psicobiología**

**INSTITUTO MEDITERRÁNEO  
PARA EL AVANCE DE LA  
BIOTECNOLOGÍA Y LA  
INVESTIGACIÓN SANITARIA**



# **LÍPIDOS TRANSMISORES Y CONDICIONAMIENTOS INDUCIDOS POR COCAÍNA: PAPEL DE LAS ACILETANOLAMIDAS Y EL ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**María Jesús Luque Rojas**

**Bajo la dirección de los doctores:**

**Fernando Rodríguez de Fonseca**

**Eduardo Blanco Calvo**

**Madrid, 2012**





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE  
MADRID



Departamento de Psicobiología  
Facultad de Psicología

**LÍPIDOS TRANSMISORES Y  
CONDICIONAMIENTOS INDUCIDOS POR COCAÍNA:  
PAPEL DE LAS ACILETANOLAMIDAS Y EL ÁCIDO  
LISOFSOFATÍDICO**

**María Jesús Luque Rojas**

**2012**



Dr. Fernando Rodríguez de Fonseca, Profesor Titular del Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid.

Dr. Eduardo Blanco Calvo, PDI postdoctoral “Juan de la Cierva”, Departamento de Psicobiología y Metodología de las CC. del Comportamiento, Facultad de Psicología, Universidad de Málaga.

**CERTIFICAN:**

Que la Licenciada Dña. María Jesús Luque Rojas ha realizado, bajo nuestra dirección, los trabajos experimentales que han conducido a la elaboración de esta Tesis Doctoral, titulada “Lípidos transmisores y condicionamientos inducidos por cocaína: papel de las aciletanolamidas y el ácido lisofosfatídico”.

Consideramos que tanto el contenido científico como la presentación de esta memoria, reúnen las condiciones necesarias para su defensa, para optar al grado de Doctor.

Y para que conste ante quien proceda, firmamos el presente certificado en Málaga

El Director de la Tesis

Fdo. Fernando Rodríguez de Fonseca

El Co-Director de la Tesis

Fdo. Eduardo Blanco Calvo



Yo, María Jesús Luque Rojas, declaro ser la autora del presente trabajo de Investigación y que lo he realizado en la Fundación IMABIS, en el Laboratorio de Medicina Regenerativa, bajo la dirección del Dr. Fernando Rodríguez de Fonseca y del Dr. Eduardo Blanco Calvo.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Málaga a 27 de febrero de 2012.

María Jesús Luque Rojas





## RESUMEN

### LÍPIDOS TRANSMISORES Y CONDICIONAMIENTOS INDUCIDOS POR COCAÍNA: PAPEL DE LAS ACILETANOLAMIDAS Y EL ÁCIDO LIFOFOSFATÍDICO.

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo la evaluación del papel de tres lípidos transmisores (endocannabinoides, oleiletanolamida y ácido lisofosfatídico), que están estructuralmente relacionados en la adquisición y expresión de los condicionamientos inducidos por cocaína.

El primer conjunto de estudios se centró en el rol de los endocannabinoides que juegan un importante papel modulador de la neurotransmisión dopaminérgica. Es decir, el sustrato de actuación de la cocaína y por ello se investigó la función de este sistema en la inducción de condicionamientos. Para ello, y como herramienta, se utilizó la inhibición de la degradación de los endocannabinoides en la actividad locomotora y estereotipias inducida por el agonista de dopamina D2, quinpirole y sensibilización conductual inducidos por el inhibidor de la recaptación de dopamina cocaína, en ratones C57BL/6J. Nuestros resultados mostraron que la inhibición de la degradación de anandamida (AEA) a través de las enzimas amida hidrolasa de ácido grasos (FAAH) y de la de 2-araquidonoil glicerol (2-AG) a través de la monoacilglicerol lipasa (MAGL) modularon la actividad dopaminérgica. La administración de quinpirole (1 mg/kg) causó una respuesta temporal bifásica diferenciando dos fases: a) inmovilidad (0-50 minutos) y b) hiperlocomoción (siguientes 70 minutos) asociándolo con la aparición de comportamientos estereotipados (salto y alzada). El tratamiento previo con los inhibidores FAAH (URB597, 1 mg/kg) y MAGL (URB602, 10 mg/kg) produjo una fuerte disminución en hiperlocomoción y comportamientos estereotipados inducidos por quinpirole. Sin embargo, la administración conjunta de inhibidores de FAAH o MAGL con el agonista dopaminérgico indirecto cocaína no atenuó los efectos agudos de la cocaína. Los inhibidores no afectan a la adquisición de sensibilización conductual y la locomoción condicionada inducida por cocaína.

En el segundo estudio, se evaluaron las acciones de las aciletanolamidas no cannabinoides. La oleiletanolamida redujo la actividad locomotora de modo dosis-dependiente y redujo drásticamente las acciones de la cocaína, tanto a nivel agudo (hiperlocomoción) como a nivel de condicionamiento (preferencia de lugar y sensibilización). Estos efectos parecen no estar mediados por el receptor de OEA PPAR $\alpha$  porque los animales KO PPAR $\alpha$  no mostraron alteraciones en su respuesta a OEA ni a cocaína, indicando que las acciones de OEA suceden a otro nivel (otros receptores para OEA).

El tercer grupo de estudios se realizó en torno al receptor ácido lisofosfatídico LPA<sub>1</sub>. Este lípido regula plasticidad y desarrollo. Los animales carentes de LPA<sub>1</sub> mostraron alteraciones en locomoción condicionada pero no en sensibilización y esto se asocia a alteraciones glutamatérgicas en el hipocampo, indicando un papel del LPA<sub>1</sub> en el establecimiento de memorias contextuales.

Los resultados obtenidos, indican que el sistema endocanabinoide podría ser una potencial diana terapéutica para el tratamiento de las patologías relacionadas con una sobre-excitación psicomotriz, apoyando el papel modulador del sistema endocanabinoide en la regulación de la locomoción mediada por dopamina. Esta modulación se realiza a través de una inhibición del sistema dopaminérgico. La OEA, parece jugar un papel importante en los condicionamientos inducidos por cocaína, mientras que en el caso del LPA estaría centrado en el establecimiento de memoria contextual asociada a la droga.



## **SUMMARY**

### **TRANSMITTERS LIPIDS AND COCAINE-INDUCED CONDITIONING: ROLE OF ACYLETHANOLAMIDES AND LYSOPHOSPHATIDIC ACID.**

This thesis evaluates the role of three lipids mediators (endocannabinoids, OEA and lysophosphatidic acid), which are structurally related on the acquisition and expression of cocaine-induced conditioning.

The first set of studies focused on the role of endocannabinoids as modulators of dopaminergic neurotransmission. This is the substrate of action of cocaine and therefore we investigated the role of this system in the induction of conditioning and its modulation by cannabinoids. To do this, and as a tool, we used the inhibition of the degradation of endocannabinoids. We compared the inhibition of anandamide (AEA) degradation through fatty acid amide hydrolase (FAAH) with that of 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) through monoacylglycerol lipase (MAGL). The administration of quinpirole (1 mg/kg) caused a temporal biphasic response distinguished for immobility (0-50 min), hyperlocomotion (next 70 min) associated with the arising of stereotyped behaviours (stereotyped jumping and rearing). Pre-treatment with inhibitors of degradation enzymes FAAH (URB597, 1 mg/kg) and MAGL (URB602, 10 mg/kg) induced a powerful decreased in quinpirole-induced hyperlocomotion and stereotyped behaviours. However, the co-administration of FAAH or MAGL inhibitors with the indirect dopaminergic agonist cocaine did not attenuate acute effects of cocaine. Both inhibitors did not affect acquisition of behavioural sensitization and cocaine-induced conditioned locomotion.

In the second study, we evaluated the actions of non-cannabinoid acylethanolamides. Oleoylethanolamide (OEA) reduced locomotor activity dose-dependently and dramatically reduced the actions of cocaine, both acute (hyperlocomotion) and level of conditioning (place preference and sensitization). These effects appear to be mediated by OEA receptor PPAR $\alpha$ , because PPAR $\alpha$ -KO animals showed no alterations in their response to OEA or cocaine, indicating that the actions of OEA occur at another level (other recipients for OEA).

The third group of studies focused on lysophosphatidic acid receptor-1 (LPA<sub>1</sub>). This lipid regulates plasticity and development. Animals lacking LPA<sub>1</sub> showed alterations in conditioned locomotion and sensitization but not in behavioral sensitization, this is associated with glutamatergic receptor abnormalities in the hippocampus, indicating a role of LPA<sub>1</sub> in establishing contextual memories through modulation of glutamate transmission.

The endocannabinoid system could be explored as a potential drug target for the treatment of cocaine addiction and pathologies related to psychomotor over-excitability. These results support the role of the endocannabinoid system in the regulation of psychomotor activity in cocaine-induced dopaminergic transmission. These data indicate that endocannabinoids exert a modulatory role on dopamine inhibitor. According with OEA, this seems to play an important role in the conditioning induced by cocaine, while that in the case of LPA this role would be focused on establishing contextual memories associated with the drug.



Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se han escrito las siguientes publicaciones, directa (D) e indirectamente (I) relacionadas:

- Almeida, B., Joglar, J., **Luque Rojas, M.J.**, Decara, J.M., Bermúdez-Silva, F.J., Macias-Gonzalez, M., Fito, M., Romero, M., Farré, M., Covas, M., Rodríguez de Fonseca, F. and De la Torre, R. (2010). Synthesis of fatty acid amides of catechol metabolites with antiobesity properties. *Chem Med Chem*, 5, 1–8. (I)
- Blanco, E., Campos-Sandoval, J. A., Palomino, A., **Luque-Rojas, M. J.**, Bilbao, A., Suárez, J., Márquez, J. y Rodríguez de Fonseca, F. (2012). Acute and chronic effects of cocaine on the expression of glutamate synthesizing enzymes and glutamate transporter genes in mouse brain. *Psychopharmacology*. 219, 933-944. (D)
- Blanco, E., Bilbao, A., **Luque-Rojas, M. J.**, Palomino, A., Bermúdez-Silva, F.J., Suárez, J., Santín, L.J., Estivill-torrús, G., Gutierrez, A., Campos-Sandoval, J. A., Márquez, J. y Rodríguez de Fonseca, F. (2012). Lack of cocaine-induced conditioned locomotion is associated with altered expression of hippocampal glutamate receptors in mice lacking LPA1 receptor. *Psychopharmacology*. 220, 27-42. (D)
- Almeida, B., Joglar, J., **Luque Rojas, M.J.**, Decara, J.M., Bermúdez-Silva, F.J., Macias-Gonzalez, M., Fito, M., Romero, M., Farré, M., Covas, M., Rodríguez de Fonseca, F. and De la Torre, R. (2012). Unsaturated Fatty Alcohol Derivatives of Olive Oil Phenolic Compounds with Potential Antiobesity Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60, 1067-1074. (I)
- Rivera, P., **Luque-Rojas, M.J.**, Pavón, F.J., Serrano, A., Crespillo, A. Vida, M., Mateos Grondona, J., Cifuentes, M., Bermúdez-Silva, F.J.; Rodríguez de Fonseca, F. y Suárez, J. (2012). Diet-dependent modulation of hippocampal expression of endocannabinoid signaling-related proteins in cannabinoid antagonist-treated obese rats. (Hippocampus) (I)
- **Luque-Rojas, M.J.**, Galeano, P., Suárez, J. Araos, P., Santín, L.J., Rodríguez de Fonseca, F. y Blanco, E. (2012). Reversion of dopamine D2-receptor-mediated hyperactivity by inhibitors of endocannabinoid degradation (Int. J. Neuropsychopharmacol.). (D)
- Bilbao, A., Blanco, E., **Luque-Rojas, M.J.**, Suárez, J., Palomino, A., Vida-Botella, M., Araos, P., Bermúdez-Silva, F.J., Fernández-Espejo, E. y Rodríguez de Fonseca, F. (2012). Oleoylethanolamide dose-dependently attenuates cocaine-induced behaviours through a PPAR $\alpha$  receptor-independent mechanism (Addiction biology). (D)



## *AGRADECIMIENTOS*

*Una Tesis Doctoral implica no sólo una serie de años dedicados a hacer experimentos y estudios para obtener datos y aportar nuevos descubrimientos al mundo que nos rodea. Una Tesis Doctoral conlleva la apertura al mundo científico y de forma contigua cambios a nivel personal, ayuda a madurar y a aprender a desarrollarse como persona.*

*Fernando Rodríguez de Fonseca, por su calidad como científico y profesional y, sobretodo, por su calidad humana. Por darme la oportunidad de poder formarme a su lado, abriéndome las puertas a la experiencia del mundo científico-laboral. Por haberme apoyado y ayudado en momentos difíciles.*

*Eduardo Blanco Calvo, por todo lo que me has enseñado. Por todas esas situaciones buenas, malas, de risas y no tantas risas compartidas. Por esos inicios en el estabulario. Un gran compañero que pasó a convertirse en Co-director, ayudándome siempre que lo necesité.*

*Al profesor Dr. Eduardo Elósegui Bandera, por esa ayuda inestimable en momentos cruciales. Gracias por todo el tiempo dedicado a intentar sacar la estadística hacia delante.*

*A mis padres, porque sin vosotros nunca habría llegado a donde he llegado. Siempre estuvisteis ahí, en todos los momentos (que fueron muchos) en que esto me vino grande. Apoyo incondicional son palabras que no se escuchan normalmente, más bien se demuestran, algo que habéis hecho siempre conmigo, en todo lo que rodea a mi persona, sin vosotros nunca habría conseguido realizar esta Tesis. Mi madre, persona especial e imprescindible donde las haya. Siempre objetiva, realista. Llegas antes que los demás y por eso siempre aciertas y sabes que responder, encontrando solución para todo. Gracias por ser mi madre, nunca habrá nadie mejor que tu. Sin ti, sin tus consejos, sin tu ayuda, ahora mismo no sería quien soy. Mi padre, mi "colega" de profesión y mi gran apoyo. Siempre estás cuando te necesito. Siempre me escuchas, siempre tienes una respuesta agradable que darme. Siempre me prestas tu ayuda. Sin ti ni esta Tesis, ni otras muchas cosas, habrían sido posibles nunca. A los dos, nunca podré agradecerlos todo, todo lo que habéis hecho por y para mí. Os quiero.*

*A mi hermana, por ser como y quien eres, por todos los momentos compartidos. Por todos estos años viviendo juntas en Málaga, sin duda la mejor persona que podía tener a mi lado. Por su compañía en los buenos y malos momentos. Por aguantarme mi mal humor, cuando había algo que no salía, algún dato que no quería salir. Sabes que sin ti, sin tus momentos de risas, sin tu compañía, no habría podido llegar a este momento y todos los que nos quedan por llegar.*



*Mi primo, más que eso, mi hermano. Muchas situaciones, muchas vivencias e infinidad de momentos juntos. Todos estos años de estudio y trabajo has estado a mi lado, aguantando y soportando mis cosas. Sin tu compañía y momentos de risas con nuestros alter egos no habría podido seguir adelante con este proyecto hasta el final, que ya se acerca.*

*Mi pareja, mi compañero, mi amigo, siempre te costó aceptar mi dedicación a este mundo de Tesis, experimentos, animales, investigación en definitiva. Sin embargo, ahí has estado siempre. Tus consejos y tu visión de futuro me han ayudado a conseguir llegar hasta este punto, tan difícil, que tan duro ha sido y tanto nos ha costado a los dos. Pero ya podemos decir que hemos llegado y juntos hasta el final. Ahora seguiremos adelante como siempre hemos deseado. Te quiero.*

*Esto no lo consigue uno mismo solo, a todos mis compañeros del Laboratorio de Medicina Regenerativa. Sin vosotros esta Tesis no habría salido adelante. Todos, de una forma u otra, me habéis ayudado, habéis aportado algo para que esta Tesis haya sido posible.*

*Patri, mi Patri, comenzaste siendo mi compañera y pasaste a ser una persona indispensable. Estuviste en todo momento, fácil, difícil, divertido, triste... Desde el principio estuviste a mi lado, hemos recorrido este camino juntas, pudiendo asegurarte que sin ti, no habría pasados buenos momentos, en este duro proceso que supone una Tesis. Como bien sabemos "somos un todo".*

*Juan Decara, mi Juanito, mi Decara, la voz de la experiencia. Gracias por ser mi compañero y amigo, gracias por escucharme cuando lo necesité, gracias por todos esos consejos, tanto profesionales y personales, siempre vinieron bien, tenían su acierto. Juan, el "error no es una opción".*

*Mónica, Ana, Mayi, Inma, Carmen, Gracias. Por todos esos momentos en el laboratorio, en los que trabajé a gusto, algo envidiable. Gracias por haberme apoyado en todo momento, gracias por haber sido mis compañeras. Toni y Javi, llegasteis casi al final de todo este proceso, pero aún así habéis sido una pieza muy importante. Un orgullo haberos tenido como compañeros. Miguel Romero, por haber estado tras el mail en todos los momentos que lo necesité, sobretodo para ponerme en contacto con Fernando. Gracias por toda la ayuda. Mis niñas, Irene, Mariam y Gloria. Mi "otro grupo" de trabajo. Sin vosotras, sin todos esos días y horas de compañía en el estabulario, por todas esas conversaciones en los tiempos de espera de los experimentos, no habría logrado pasar momentos amenos en un sótano rodeada de animales. Una suerte haberos tenido acompañándome en el recorrido de esta tesis. Mi Anita, que sin tu inestimable ayuda en las cuestiones administrativas en la "Complu", todo habría sido más difícil de sobrellevar. Esta Tesis ha llegado a este punto gracias a ti.*

*Este largo camino recorrido llega a su fin, habiendo solventado muchos problemas y obstáculos profesionales y personales, que abrirán la puerta, bajo la perspectiva de la experiencia, a nuevos proyectos que realizar. No hay más que añadir que la palabra GRACIAS. Palabra que siempre genera un halo de positividad en momentos complicados.*

*A todos los que habéis estado a mi lado, a todos los que me habéis ayudado. Gracias.*



*A mis padres, por ser únicos*

*A mi hermana*

*A ti*

*Aunque las cosas nos vengan grandes,  
parezcan imposibles de alcanzar, siempre hay un momento  
en el que creemos que lo conseguimos, aferrémonos a él,  
nos da el impulso de continuar y seguir aprendiendo*

*(Luque<sup>2</sup>)*



## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>29</b>
<b>1. Lípidos transmisores .....</b>	<b>31</b>
1.1. Sistema endocannabinoide .....	31
1.1.1. Neurobiología del sistema endocannabinoide.....	31
1.1.2. Los receptores cannabinoides. ....	32
1.1.3. Ligandos endógenos. ....	37
1.1.3.1. Farmacología del sistema endocannabinoide. ....	37
1.1.4. Cannabinoides y conducta. ....	41
1.1.4.1. Cannabinoides y conducta motora. ....	41
1.1.4.2. Cannabinoides y procesos de refuerzo .....	42
1.2. OEA. ....	44
1.2.1. PPAR $\alpha$ .....	44
1.3. LPA.....	47
1.3.1. LPA1. ....	47
<b>2. Cocaína y comportamiento .....</b>	<b>49</b>
2.1. Neurobiología de la cocaína.....	49
2.2. Cocaína y sensibilización conductual.....	52
2.3. Cocaína y condicionamiento contextuales:.....	55
2.3.1. Locomoción condicionada. ....	55
2.3.2. Preferencia de lugar.....	56
<b>3. Interacciones entre endocannabinoides, dopamina y ácido lisofosfatídico. ....</b>	<b>57</b>
<b>II. OBJETIVOS, PLANTEAMIENTO e HIPÓTESIS .....</b>	<b>63</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>71</b>
<b>1. Animales de experimentación .....</b>	<b>71</b>
<b>2. Tratamientos: Drogas.....</b>	<b>72</b>
<b>3. Estudios de comportamiento.....</b>	<b>73</b>
3.1. Manipulación de animales .....	73
3.2. Test de evaluación de locomoción: Campo abierto. ....	75
3.2.1. Smart v2.5. ....	76

3.3. Test de evaluación de estereotipias: Test de medición en cilindros (TMC)...	78
3.4. Test de evaluación de Lugar Preferencial. ....	80
<b>4. Diseño experimental.</b> .....	81
4.1. Protocolo de curvas dosis-respuesta. ....	81
4.2. Estudio de locomoción, estereotipias y salto tras la administración de un agonista D2/D3 (quinpirole) .....	81
4.2.1. Locomoción, estereotipias y salto inducido por la administración de quinpirole .....	82
4.2.2. Efecto de la administración de inhibidores de la degradación enzimática de FAAH y MAGL sobre estereotipias y salto.....	82
4.3. Protocolo de Sensibilización Conductual a cocaína .....	83
4.3.1. SC modulada por agonistas no cannabinoides.....	83
4.4. Análisis del papel de la OEA y su receptor PPAR $\alpha$ , en SC inducida por cocaína y CLP .....	85
4.4.1. Efectos de OEA-cocaína en la respuesta locomotora aguda .....	85
4.4.2. Efectos de la administración de OEA en SC inducida por cocaína. ....	85
4.4.3. Efecto de OEA en CLP inducida por cocaína.....	86
4.4.4. SC inducida por cocaína en animales KO-PPAR $\alpha$ . ....	87
4.4.5. CLP inducido por cocaína en animales KO PPAR $\alpha$ . ....	87
4.4.6. Extinción-restablecimiento en ratones KO-PPAR $\alpha$ . ....	87
4.4.7. Efectos de OEA en SC inducida por cocaína en ratones KO-PPAR $\alpha$ . ....	88
4.5. Protocolo de sensibilización conductual a cocaína en animales KO-maLPA $_1$ ...	88
<b>5. Análisis estadísticos.</b> .....	89
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	<b>93</b>
<b>ESTUDIO 1. Reversión de la hiperactividad inducida por los receptores de dopamina D2 mediada por los inhibidores de la degradación de endocannabinoides.</b> .....	<b>93</b>
1. Hiperactividad e inmovilidad inducida por el tratamiento agudo con quinpirole en ratones C57/BI6J. ....	93
2. Estereotipias provocadas por el tratamiento agudo con quinpirole en ratones C57/BI6J. ....	96

## Índice

3. Los inhibidores FAAH y MAGL no modifica el comportamiento estereotipado, locomoción, ansiedad y/o habituación en animales C57/BI6J.....	99
4. Administración de inhibidores de FAAH y MAGL con quinpirole contrarresta la hiperactividad y estereotipias.....	102
5. Efectos de los inhibidores de FAAH y MAGL en la actividad inducida por cocaína. ....	103
DISCUSIÓN ESTUDIO 1.....	109
CONCLUSIONES ESTUDIO 1.....	113
 <b>ESTUDIO 2. <i>La oleiletanolamida atenúa de modo dosis-dependiente los comportamientos inducidos por cocaína a través de un mecanismo independiente del receptor de PPAR<math>\alpha</math></i></b> .....	115
1. Efectos de la interacción OEA-cocaína en locomoción aguda.. ....	115
2. Efecto de la OEA en CLP inducido por cocaína.....	116
3. Efectos de la OEA en SC inducida por cocaína.....	117
4. Efectos de la OEA sobre LC inducida por cocaína .....	119
5. Exploración de locomoción en contexto familiar o nuevo en animales WT-KO-PPAR $\alpha$ . ....	120
6. Efecto de la cocaína en la LC y SC en ratones KO-PPAR $\alpha$ . ....	121
7. Efecto de la cocaína en expresión, extinción y restablecimiento de CLP en ratones KO-PPAR $\alpha$ . ....	123
8. Efectos de la OEA sobre la LC y SC inducida por cocaína en ratones KO-PPAR $\alpha$ . ....	125
DISCUSIÓN ESTUDIO 2.....	127
CONCLUSIONES ESTUDIO 2.....	131
 <b>ESTUDIO 3. <i>Estudio de la atenuación de la locomoción condicionada inducida por cocaína en la expresión de receptores de glutamato del hipocampo en ratones carentes del receptor LPA<math>_1</math></i></b> .....	133
1. Efecto de la administración de cocaína en ratones KO-maLPA $_1$ .....	133
2. Condicionamiento con cocaína en ratones KOmaLPA $_1$ .....	134



## *Índice*

3. LC a cocaína y SC inducida por cocaína en ratones KO-maLPA <sub>1</sub> .....	135
4. LC y SC inducida por cocaína en animales KOmaLPA <sub>1</sub> evaluados de forma independiente .....	136
5. Resultados inmunohistoquímicos.....	141
DISCUSIÓN ESTUDIO 3.....	143
CONCLUSIONES ESTUDIO 3.....	151
 <b>V. DISCUSIÓN GENERAL.</b>	 <b>150</b>
 <b>VI. CONCLUSIONES GENERAL.</b>	 <b>167</b>
 <b>VII. BIBLIOGRAFÍA.</b>	 <b>165</b>
 <b>VIII. ANEXOS.</b>	 <b>165</b>

## ABREVIATURAS

---



<b>2-AG:</b>	2-araquidonil glicerol
<b>AEA:</b>	Anandamida
<b>ATV:</b>	Área Tegmental Ventral
<b>CB1:</b>	Receptor cannabinoide tipo 1
<b>CLP:</b>	Condicionamiento de Lugar Preferencial
<b>CPM:</b>	Córtex Prefrontal Medial
<b>DA:</b>	Dopamina
<b>DAT:</b>	Transportador de dopamina
<b>ECS:</b>	Endocannabinoides
<b>E.E.M:</b>	Error Estándar de la Media
<b>FAAH:</b>	Amido-hidrolasa de ácidos grasos
<b>GABA:</b>	Ácido gamma-aminobutírico
<b>Gi/s:</b>	Proteína G inhibidora/estimuladora
<b>i.p.:</b>	Intraperitoneal
<b>KO:</b>	Knock-out
<b>LC:</b>	Locomoción condicionada
<b>LPA:</b>	Ácido Lisofosfatídico
<b>LPA1:</b>	Receptor LPA tipo 1
<b>DLP:</b>	Depresión a largo plazo
<b>PLP:</b>	Potenciación a largo plazo
<b>MAGL:</b>	Mono-Acil Glicerol Lipasa
<b>maLPA1:</b>	Receptor LPA tipo 1, variante <i>Málaga</i>
<b>Nac:</b>	Núcleo accumbens
<b>Naes:</b>	N-aciletanolamidas
<b>NAPE:</b>	N-acilfosfatidiletanolamida
<b>OEA:</b>	Oleiletanolamida
<b>OF:</b>	Open field
<b>PEA:</b>	Palmitoiletanolamida
<b>PPAR<math>\alpha</math>:</b>	Receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas $\alpha$
<b>GPR55/119:</b>	Receptores acoplados a proteínas G (55, 119)
<b>QNP:</b>	Quinpirole
<b>SC:</b>	Sensibilización conductual
<b>s.c.:</b>	Subcutáneo
<b>SNC:</b>	Sistema nervioso central

<b>SNP:</b>	Sistema nervioso periférico
<b>TH:</b>	Tiroxina hidroxilasa
<b>TRPV1:</b>	Receptor vanilloide tipo-1
<b>TMC:</b>	Test de medición en cilindros
<b>WT:</b>	Wild-type
<b><math>\Delta^9</math>-THC:</b>	Delta-9 tetrahidrocannabinol

# I. INTRODUCCIÓN

---



## 1. Lípidos transmisores.

### 1.1. Sistema endocannabinoide.

Los cannabinoides constituyen un conjunto de compuestos psicoactivos, presentes en la resina secretada a partir de las hojas y brotes florecidos de la planta *cannabis sativa*, cuyo nombre fue acuñado en 1753 por el botánico sueco Carolus Linnaeus.

El uso y las preparaciones del *cannabis sativa* se remontan a China, alrededor del año 2727 a.c., utilizada con fines medicinales. 700 años después, se usó en la India para celebrar ceremonias e hitos religiosos de donde se extiende a Occidente apreciándose sobre todo en la aplicación y manufactura de tejidos y sogas. En Europa, su uso primitivo, fue hacer cuerdas y telas, hasta que atrajo la atención de los científicos europeos cuando las tropas de Napoleón volvieron de Egipto con el descubrimiento singular de la actividad psicotrópica de la planta (Piomelli, 2003). Curiosamente, en 1810, un miembro de la Comisión de Napoleón de las Ciencias y las Artes escribió:

*“Para los egipcios, el cáñamo es la planta por excelencia, no para los usos que hacemos de ella en Europa y muchos otros países, sino por sus efectos peculiares. El cáñamo cultivado en Egipto es, en efecto embriagador y estupefaciente”*

En 1848, previamente a las amplias descripciones sobre la planta y el conocimiento de las propiedades médicas del *cannabis sativa*, la Farmacopea Británica hizo comentarios indicando, con bastante detalle, los efectos psicotrópicos del cannabis, señalando sus características analgésicas y antiespasmódicas (Piomelli, 2003).

Aunque las referencias al uso del *cannabis sativa* con propósitos sanitarios se fijan en más de 4000 años atrás, sin embargo, la estructura química de sus principales compuestos psicoactivos ( $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol, THC), no fue identificada hasta pasada la mitad del siglo XX (Navarro y Rodríguez de Fonseca, 1998). El uso recreativo del cannabis ha sido conocido desde siglos, sin embargo, su abuso se incrementó de forma drástica en Europa y Estados Unidos durante las últimas décadas (generaciones de finales de los 50 y las décadas 60 y parte de los 70 del pasado siglo) con acontecimientos sociales y culturales como el movimiento *hippie* o la guerra de Vietnam. Es conocido que el cannabis y sus derivados producen sentimientos de euforia, alto bienestar en los seres humanos, efectos que probablemente son centrales tanto en el refuerzo y la tendencia a la repetición del consumo de la sustancia como al

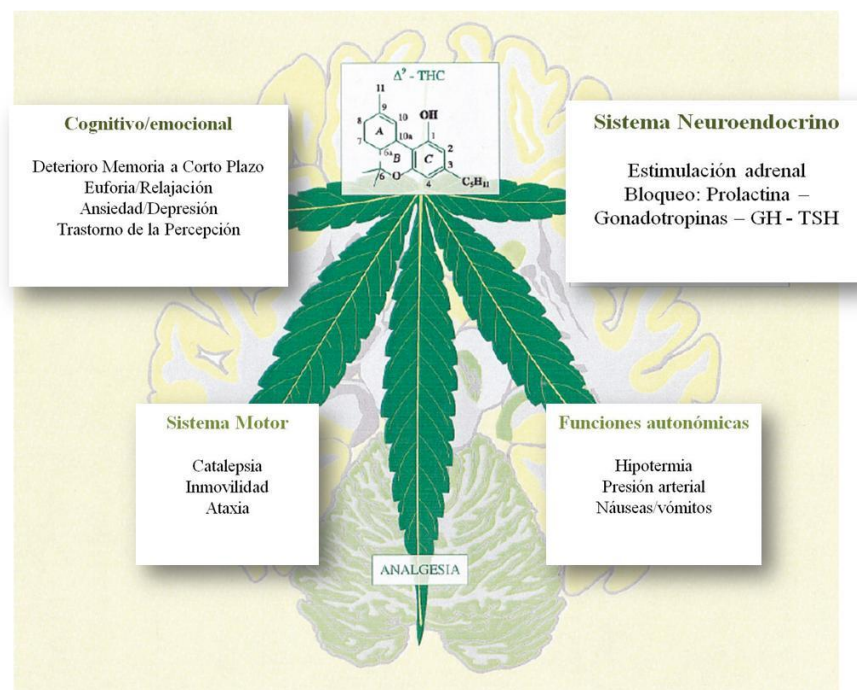
---



desarrollo de la dependencia (Navarro y Rodríguez de Fonseca, 1998; Solinas, Yasar y Goldberg, 2007).

Por tanto, los cannabinoides forman un grupo de compuestos psicoactivos con origen en la resina de la planta *cannabis sativa*. Los preparados que se obtienen de ella, como el hachís y la marihuana, se podrían considerar como las drogas de abuso ilegales más consumidas en el mundo (Navarro y Rodríguez de Fonseca, 1998; Solinas, Yasar y Goldberg, 2007).

El THC puede producir cambios en ambos sistemas básicos, tales como los que regulan la temperatura corporal, presión arterial, o niveles neuroendocrinos, y los relacionados con funciones cerebrales, tales como el control de la actividad motora, el aprendizaje y la memoria o la regulación de las respuestas emocionales. Estos efectos dependen de la distribución de los receptores CB1, densamente presentes en los ganglios basales, cerebelo y estructuras límbicas como el hipocampo y corteza cerebral (Navarro y Rodríguez de Fonseca, 1998) (figura 1).



**Figura 1.** Efectos farmacológicos del THC, sobre el Sistema Nervioso Central y Periférico (Navarro y Rodríguez de Fonseca, 1998).

El principal responsable de las propiedades psicoactivas de la planta es el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), compuesto que se aisló experimentalmente por Gaoni y Mechoulam en 1964. Este descubrimiento junto con la caracterización de los receptores cannabinoides, son considerados hitos importantes en la investigación del cannabis (Navarro y Rodríguez de Fonseca, 1998; Berrendero, 2002).

#### *1.1.1.- Neurobiología del sistema Endocannabinoide.*

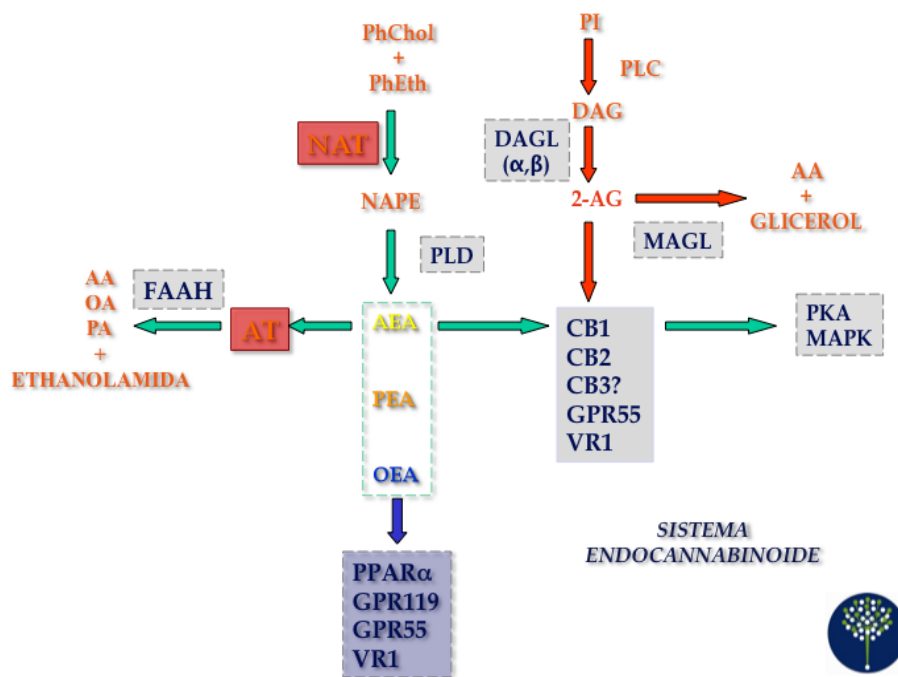
El sistema cannabinoide endógeno está formado por receptores cannabinoides (CB), sus ligandos endógenos para estos receptores y las enzimas que intervienen en la síntesis y degradación de estos ligandos endógenos (Navarro y Rodríguez de Fonseca, 1998; Solinas, Yasar y Goldberg, 2007; Solinas, Goldberg y Piomelli, 2008; Fernández-Ruiz, Hernández y Ramos, 2010).

Los cannabinoides se sintetizan *a demanda*, es decir, cuando se necesitan y liberándose al exterior seguidamente a su producción. Así, son similares a otros moduladores como prostaglandinas y leucotrienos y diferentes a los neurotransmisores clásicos, que se almacenan en vesículas antes de ser liberados (Bisogno, *et al.*, 2005). Los endocannabinoides se sintetizan y liberan en respuesta a un incremento en la concentración intracelular de calcio, producida por una despolarización, o tras activación de un receptor metabotrópico acoplado a Gq, lo que sugiere que se producen en momentos de intensa actividad del Sistema Nervioso Central (Bisogno, *et al.*, 2005).

Bioquímicamente, los endocannabinoides son una familia de moléculas de señalización lipídicas, que tienen un papel fundamental en la modulación de diferentes condiciones fisiológicas y fisiopatológicas en el sistema nervioso central (SNC) y en la periferia. Aunque hay una serie de compuestos endógenos con actividad endocannabinoide similar, el mejor caracterizado es la AEA y el 2-Araquidonil glicerol (2-AG). El sistema endocannabinoide, funciona como un sistema de señalización retrógrada en una gran cantidad de sinapsis del SNC, concretamente en las sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas (Fernández-Ruiz, Hernández y Ramos, 2010).

Una vez producidos, los endocannabinoides inhiben la liberación de neurotransmisores y se mueven dentro de la célula a partir de una proteína transportadora, donde se desactiva por dos enzimas principales, FAAH, que cataboliza la AEA, y la monoacilglicerol lipasa (MAGL), que cataboliza el 2-AG (Maldonado, Valverde y Berrendero, 2006; Luchichi, *et al.*, 2010) (figura 2).

---



**Figura 2.** Representación esquemática de las vías de señalización del sistema endocannabinoide.

El sistema endocannabinoide regula la neurotransmisión en las regiones cerebrales correspondientes a las acciones neurobiológicas y de comportamiento de las drogas adictivas (Maldonado, Valverde y Berrendero, 2006; Luchichi, *et al.*, 2010)

El sistema cannabinoide endógeno está formado por receptores cannabinoides tipo 1 (CB1), y tipo 2 (CB2), limitados al sistema nervioso periférico, ligandos endógenos como la AEA y el 2-AG (Lesscher, *et al.*, 2005).

### 1.1.2.- Los receptores cannabinoides.

Los receptores cannabinoides juegan un papel importante en una variedad de funciones fisiológicas y se han considerado objetivos farmacológicos para el tratamiento de diferentes trastornos, entre ellos la obesidad, trastornos del SNC, entre otros (Dillon, *et al.*, 2011).

Los cannabinoides ejercen su acción farmacológica mediante la activación de receptores específicos de membrana, caracterizándose actualmente los dos receptores cannabinoides, el receptor CB1 y el receptor CB2 (Bisogno, *et al.*, 2005). Ambos receptores para cannabinoides pertenecen a la familia de receptores asociados a proteínas G ( $G_{i/o}$ ), determinado por la presencia de siete dominios transmembrana, como es el caso de los receptores metabotrópicos para las monoaminas y los

neuropéptidos (Bisogno, *et al.*, 2005; Pertwee, 2005; Grotenhermen, 2006). Existe una amplia variedad de moléculas que actúan como agonistas de los receptores cannabinoides, esto es, activadores de las respuestas mediadas por ellos. Desde el punto de vista farmacológico estos ligandos se clasifican en agonistas no selectivos, agonistas selectivos CB1 y agonistas selectivos CB2.

Los endocannabinoides actúan y ejercen funciones a diferentes niveles. Así, juegan una función moduladora en varios procesos fisiológicos, principalmente en el cerebro, pero también, en diversos procesos periféricos como la regulación inmune, el sistema cardiovascular, los procesos endocrinos reproductivos y el control del metabolismo energético. En el cerebro, los endocannabinoides participan en procesos tales como el control del movimiento, la nocicepción, el sistema de recompensa cerebral, el aprendizaje y la memoria, la alimentación y vómitos. Además, ejercen un papel importante en varios hechos relacionados con el desarrollo del cerebro (Solinas, Goldberg y Piomelli, 2008; Wegener, *et al.*, 2008; Fernández-Ruiz, Hernández y Ramos, 2010)

La activación de los receptores CB1 da lugar a los típicos efectos sobre la circulación y la *psique*, conocidos tras el consumo de cannabis, mientras que la de los CB2, no los produce (Grotenhermen, 2006), aunque el papel del receptor CB2 está sometido a un intenso debate científico.

### **Receptor CB1 y sus características**

El receptor CB1 se clonó en 1990 a partir de una librería de cDNA de corteza cerebral de cerebro de rata, caracterizándose en humano a partir de tronco cerebral. Se ha observado una homología del 93% en la secuencia de nucleótidos y del 98% en la secuencia de aminoácidos con respecto a la rata (Bisogno, *et al.*, 2005; Grotenhermen, 2006; Solinas, Yasar y Goldberg, 2007).

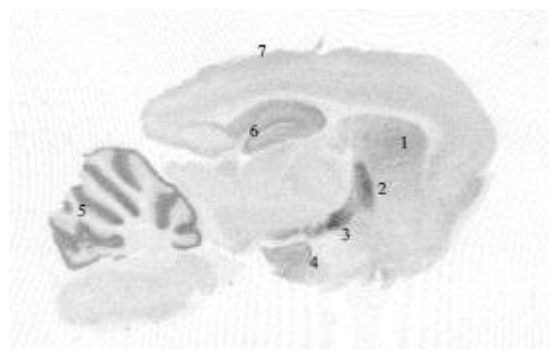
Este receptor se expresa densamente en el SNC, pudiéndose encontrar en varias regiones: neocorteza, hipocampo, núcleo accumbens, ganglios basales, el hipotálamo, la amígdala y cerebelo (Solinas, Goldberg y Piomelli, 2008). Este receptor, es altamente localizado en el cerebro, mediando la mayoría de las propiedades psicoactivas del cannabis (Solinas, Goldberg y Piomelli, 2008). Son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas Gi/o, cuya activación da lugar a la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa y en una disminución en el contenido de AMPc citosólico, cierre de los

---

canales  $\text{Ca}^{++}$ , apertura de canales de  $\text{K}^{+}$  y en una estimulación de la fosforilación de la tirosina quinasas, serina y residuos de treonina en las proteínas. Los receptores CB1 se localizan preferentemente a nivel presináptico y, por tanto, se cree que inhiben la liberación de glutamato, GABA y otros neurotransmisores (Solinas, Goldberg y Piomelli, 2008).

El receptor CB1 es considerado uno de los receptores acoplados a proteínas G más abundantes en el cerebro de los mamíferos (Piomelli, 2003). Su localización en el cerebro es consistente con los efectos centrales de los cannabinoides, con altas concentraciones en las áreas involucradas en la memoria (hipocampo), la coordinación motora (cerebelo) y emotividad (corteza prefrontal). En el sistema dopaminérgico mesolímbico, el circuito más conocido involucrado en los procesos motivacionales, el promedio a altas concentraciones de receptores CB1, se encuentran en la región terminal, el cuerpo estriado, mientras que bajas concentraciones de los receptores CB1 se encuentran en el origen del área tegmental ventral (ATV) (Solinas, Goldberg y Piomelli, 2008).

A través de técnicas autorradiográficas e inmunohistoquímicas, se aprecia que la localización y distribución de este receptor, tiene una mayor densidad en los ganglios basales (sustancia negra, globo pálido, núcleo caudado-putamen), capa molecular del cerebelo y regiones del hipocampo (figura 3) (Piomelli, 2003; Pazos, *et al.*, 2005; Solinas, Goldberg y Piomelli, 2008).



**Figura 3.** Corte sagital de cerebro de rata, en la que se encuentra distribuido CB1. 1: Caudado-Putamen; 2: Globo Pálido; 3: Núcleo entopeduncular; 4: Sustancia Negra; 5: Cerebelo; 6: hipocampo; 7: Corteza cerebral. (Herkenham *et al.*, 1990; Tsou *et al.*, 1998).

Aunque su localización sea principalmente en el SNC, también se ha observado a nivel periférico, encontrándose en el bazo, amígdalas, corazón, próstata, útero, ovarios y niveles presinápticos en terminales simpáticos (Sugiura, *et al.*, 2002).

Existe cierta relación entre la distribución de los receptores CB1 y los efectos farmacológicos de los cannabinoides. En este sentido, la alta densidad de localización de receptores CB1 en los ganglios basales, está implicada en la actividad locomotora de los roedores. Así, ha podido observarse la aparición de catalepsia en ratones. Por otro lado, la existencia de receptores CB1 en hipocampo y áreas corticales, señalaría la relación con aspectos de memoria y aprendizaje y propiedades anticonvulsivantes de los receptores cannabinoides. Además, se podría explicar la baja toxicidad y ausencia de letalidad de la marihuana, a partir de la baja densidad de receptores en áreas del tallo cerebral, que controla funciones respiratorias y cardiovasculares (Fernández-Ruiz, Hernández y Ramos, 2010).

El receptor CB1 ejerce una función importante en la modulación de la liberación de distintos neurotransmisores. Hay abundantes receptores CB1 en las terminaciones nerviosas, tanto centrales como periféricas, inhibiendo la liberación de otros neurotransmisores. De ésta manera, la activación de los receptores CB1 protege al sistema nervioso contra la sobreactivación o la sobreinhibición, provocada por los neurotransmisores (Grotenhermen, 2006).

El receptor cannabinoide CB1, se ha visto implicado en aspectos reforzantes de los compuestos derivados del  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) (Maldonado y Rodríguez de Fonseca, 2002), y además de los que provienen de opiáceos como la heroína y la morfina (Lesscher, *et al.*, 2005).

Los efectos centrales mediados por los endocannabinoides agonistas del CB1, son similares a los de la marihuana e implican disminución del movimiento, baja temperatura corporal, analgesia, y dificultades en procesos mnésicos (Breivogel y Childers, 1998; Mangieri y Piomelli, 2007). En humanos, los cannabinoides resultan en déficits en la memoria a corto plazo, problemas en la percepción del temporo-espacial y otras funciones cognitivas superiores. Además, producen un efecto bifásico eufórico-disfórico, dependiendo de la experiencia anterior del individuo y de la dosis administrada, efectos conductuales que también se pueden explicar en base a la distribución regional de los receptores cannabinoides y a las proteínas G activadas por receptores en el cerebro (Rodríguez de Fonseca, 2004).

### **Receptor CB2 y sus características**

El receptor CB2 fue descubierto en 1993, caracterizándose a partir de células linfoides de bazo de rata, y con una localización principal en células del sistema inmune

---

y los tejidos hígado, páncreas... (Bisogno, Ligresti y DiMarzo, 2005). Inicialmente, se creyó que su localización era exclusiva en el sistema nervioso periférico, pero estudios actuales, señalan la presencia de CB2 en alguna región del cerebro (Solinas, Goldberg y Piomelli, 2008). La presencia de CB2 en estos tejidos y células del Sistema Nervioso Periférico, parece estar relacionada con las propiedades inmunosupresoras de los cannabinoides (Pazos, *et al.*, 2005)

Aunque algunos grupos de investigación no han podido identificar la presencia de receptores CB2 en cerebros sanos, sin embargo, existen grupos que han demostrado la expresión de CB2, en células microgliales de rata y otras células del cerebro asociadas durante la inflamación (Onaivi, *et al.*, 2008). Estos investigadores (Onaivi, *et al.*, 2008) demostraron que la expresión funcional de receptores CB2 en el cerebro, pueden proporcionar nuevas dianas para los efectos de los cannabinoides en la depresión y los trastornos de abuso de sustancias, alcanzando objetivos de estudio en relación a los receptores CB2, más allá de la actividad *neuroimmunocannabinoide*.

En este sentido, existen estudios que hacen referencia a la implicación de receptores CB2 y aspectos neurológicos (Viscomi, *et al.*, 2009), o que supera la barrera de la relación entre CB2 y periferia (Onaivi, *et al.*, 2008). Viscomi, *et al.*, (2009) estudiaron la capacidad de agonistas y antagonistas selectivos, moduladores de la actividad del receptor cannabinoide CB2. Así, encontraron que el agonista JWH-015 reduce la pérdida neuronal y la liberación de Citocromo C, conduciendo a la recuperación neurológica. Asimismo, estos efectos fueron revertidos por el antagonista selectivo SR144528.

Puesto que los compuestos que activan selectivamente los receptores CB2 (agonistas CB2), son aún foco de estudio en cuanto a su implicación con efectos psicológicos, se está convirtiendo cada vez más en blanco de la investigación de las aplicaciones terapéuticas de los cannabinoides, como, por ejemplo, analgésico, antiinflamatorio y antineoplásico (Grotenhermen, 2006).

---



### 1.1.3.- Ligandos endógenos.

Tras la aparición y/o descubrimiento de los receptores cannabinoides, se significaron los ligandos endógenos o endocannabinoides, que a nivel cerebral actúan como neuromoduladores (Piomelli, *et al.*, 1998; Grotenhermen, 2006).

Fue en la década de los 90, cuando se definieron los primeros ligandos cannabinoides, a partir de un extracto lipídico de cerebro de cerdo (DiMarzo y Deutsch, 1998; Fride, 2002), resultando en una amida de ácido araquidónico, conocido como AEA y 2-AG (Solinas, Goldberg y Piomelli, 2008).

Aunque la AEA y el 2-AG posean una estructura similar, existen diferencias sustanciales entre ambos. La AEA es un ligando del receptor CB1 (localizado en el SNC) y considerada un ligando de receptores de membrana, perteneciente a la superfamilia de proteínas receptoras acopladas a proteínas G. Dado que la anandamida actúa en el mismo receptor que los compuestos activos de la marihuana, a estos compuestos se les conoció como *endocannabinoides* (Rodríguez de Fonseca, 2004).

Los endocannabinoides cumplen algunas de las características necesarias de los neurotransmisores clásicos: se sintetizan y liberan a partir de neuronas, son capaces de unirse y activar receptores de membranas y son inactivados por recaptación y degradación enzimática en el interior de la célula. Sin embargo, los endocannabinoides no se acumulan en el interior de vesículas sinápticas como otros neurotransmisores, sino como mediadores que se sintetizan según la demanda (Di Marzo, *et al.*, 1994), actúan en las proximidades del lugar donde se han liberado y, una vez que han ejecutado su función, son rápidamente inactivados por la acción de enzimas específicas de degradación (Piomelli, 2003).

#### 1.1.3.1- Farmacología del sistema endocannabinoide.

Los cannabinoides ejercen sus efectos sobre el organismo, a través de la activación de receptores específicos de membrana, receptores para cannabinoides que pertenecen a la familia de receptores asociados a proteínas G, caracterizado por la presencia de siete dominios transmembrana (Bisogno, *et al.*, 2005; Solinas, Yasar y Goldberg, 2007).

---

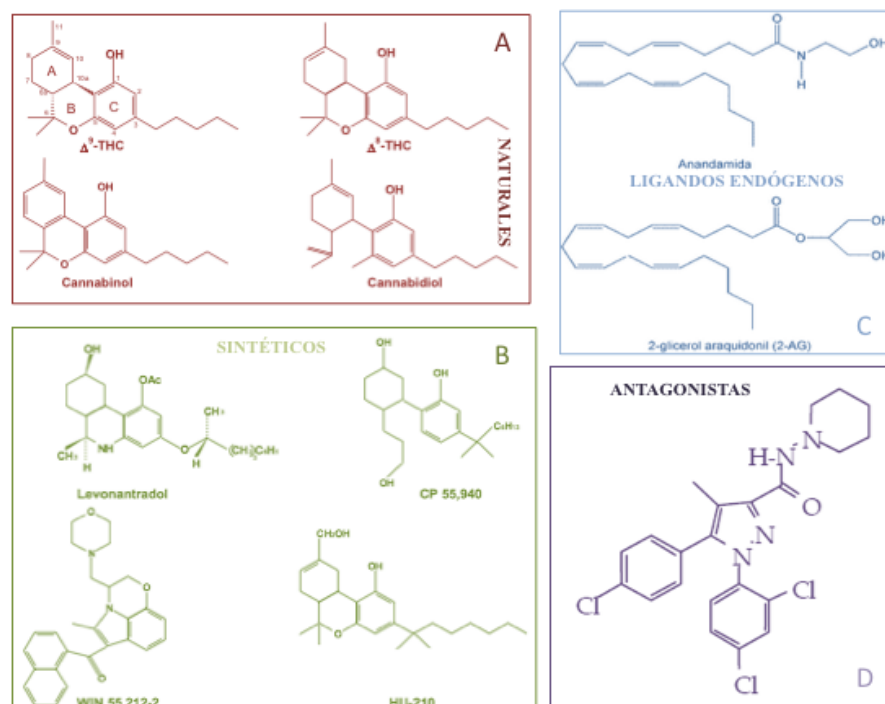


Con el descubrimiento de los receptores cannabinoides y sus ligandos endógenos, se hizo posible el desarrollo de agonistas o antagonistas cannabinoides (agentes que activan o se unen, pero no activa el receptor).

Existe una amplia variedad de moléculas que se comportan como agonistas de los receptores cannabinoides, activando las respuestas mediadas por éstos. Los agonistas cannabinoides han sido clasificados en función de su estructura química en cuatro clases (figura 4):

- *Cannabinoides clásicos.* Cannabinoides derivados de la cannabis sativa como el  $\Delta^9$ -THC, el  $\Delta^8$ THC, el cannabinoil o el cannabidiol, y los análogos sintéticos del  $\Delta^9$ -THC como el (-)-11-hidroxi- $\Delta^8$ -tetrahidrocannabinol-dimetilheptil o HU210, el HU243 y la nabilona.
- *Cannabinoides no clásicos.* Pertenecen a este grupo los compuestos CP-55,940 que se usó para la caracterización del receptor CB1 (Devane, *et al.*, 1988), y otros agonistas cannabinoides como el CP55,244; CP50,556 o levonantradol y el desacetilevantradol o DALN.
- *Aminoalquilindoles.* Constituyen la tercera clase de agonistas de receptor cannabinoide. Su principal representante es el WIN 55,212-2.
- *Eicosanoides.* Último grupo descrito de agonistas cannabinoides, son derivados del ácido araquidónico. En este grupo se incluyen los ligandos endógenos, siendo el representante principal la araquidonil etanolamida o anandamida. Además existen otros componentes como el 2-AG, el 2-araquidonil gliceril éter y los derivados sintéticos como la araquidonil- 2-cloroetilamida (ACEA) y la araquidonilciclopropilamida (ACPA) (Pertwee y Ross, 2002).

El antagonista cannabinoide CB1 por excelencia, más utilizado hasta la fecha ha sido el SR141716A (Rinaldi-Carmona, *et al.*, 1994). Este compuesto manifiesta una marcada selectividad, de modo que es capaz de prevenir o revertir las acciones de los agonistas cannabinoides tanto *in vitro* como *in vivo* que actúan en el receptor cannabinoide CB1 (Pertwee, 1997).



**Figura 4.** Estructura química de algunos de los cannabinoides más representativos. A. Agonistas naturales:  $\Delta^9$ -THC, cannabinol y cannabidiol. B. Agonistas sintéticos: CP55,244, levonantradol, WIN 55,212-2 y HU210. C. Ligandos endógenos: Anandamida y 2-AG. D. Antagonistas: SR141716A (Rimonabant).

Estos tipos de ligandos, agonistas y antagonistas, pueden actuar como instrumentos terapéuticos o ayudar a determinar las funciones de los receptores cannabinoides y el propio funcionamiento de cannabinoides endógenos propios (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2008).

De acuerdo a esta afirmación, se ha observado la implicación y participación del sistema endocannabinoide a diferentes niveles fisiológicos.

- a) Efectos antinociceptivos: La participación del sistema endocannabinoide en la nocicepción ha sido suficientemente constatada por numerosos trabajos. El THC y sus derivados sintéticos han demostrado ser eficaces en la mayoría de los modelos animales de dolor. Estos efectos antinociceptivos son mediados por los receptores cannabinoides en el cerebro que a su vez parecen interactuar con los sistemas noradrenérgico y opioides kappa en la médula espinal, para modular la percepción de los estímulos dolorosos (Martin y Lichtman, 1998). El receptor CB1, se expresa intensamente en áreas centrales claves en la nocicepción (como la sustancia gris periacueductal o el asta dorsal de la médula) y parece mediar los efectos antinociceptivos de los cannabinoides, Numerosos trabajos han mostrado

el efecto antinociceptivo de los cannabinoides en modelos experimentales de dolor agudo (Clapper, *et al.*, 2010).

- b) Efectos sobre la memoria: Diferentes estudios han demostrado que el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol, produce déficits de memoria, similares a las producidas por lesiones neuroquímicas en hipocampo. Los animales entrenados en tareas de comportamiento después de la lesión pueden realizar la tarea, pero aprenden estrategias de comportamiento diferentes (Hampson y Deadwyler, 1998). Agonistas cannabinoides perjudican el rendimiento de comportamiento de manera similar a la producida por las lesiones, además de cambiar la estrategia de respuesta conductual (Hampson y Deadwyler, 1998). Si tenemos en cuenta que el hipocampo es la estructura involucrada en la memoria, los agonistas cannabinoides han demostrado interferir en la potenciación del hipocampo a largo plazo (LTP). Estos hallazgos sugieren que el hipocampo podrían estar involucrado en los efectos cannabinoides mediados en la memoria (Wegener, *et al.*, 2008).
- c) Efectos endocrinos y control sobre la temperatura corporal: El cannabis ejerce funciones inductoras del apetito desde hace siglos, habiéndose acumulado un cierto número de evidencias científicas, que señalan la implicación del sistema endocannabinoide en la regulación del apetito, la ingesta y el peso corporal (Komorowski y Stepień, 2007; Bermúdez-Silva, *et al.*, 2009). El sistema endocannabinoide no sólo regula los mecanismos centrales y periféricos de la ingesta de alimentos, sino también la síntesis de lípidos y volumen en el hígado y tejido adiposo, así como el metabolismo de la glucosa en las células musculares (Komorowski y Stepień, 2007). A pesar de que los receptores cannabinoides parecen jugar un papel importante en la capacidad del sistema endocannabinoide para influir en la liberación de hormonas, será necesario estudiar más acerca de su función en la regulación neuroendocrina de la secreción de hormona (Murphy, *et al.*, 1998).
- d) Efectos emocionales-motivacionales: Los agonistas cannabinoides inducen efectos complejos y contradictorios, sobre la ansiedad en seres humanos y animales de experimentación. Los datos de ensayos con animales, proporcionan evidencias de la modulación bidireccional dosis-dependiente de ansiedad, por el sistema cannabinoide y la importancia del contexto ambiental. El bloqueo
-

farmacológico de receptores CB1 da lugar a un aumento de ansiedad en ratas, observándose como la inhibición del metabolismo de la anandamida, produce efectos ansiolíticos. En este sentido, el sistema endocannabinoide parece jugar un papel fundamental en la regulación de los estados emocionales y puede constituir una nueva diana farmacológica para el tratamiento contra la ansiedad (Viveros, Marco y File, 2005). Con el uso de agonistas de receptores cannabinoides, en animales de experimentación, existe una creciente evidencia de que la activación fisiológica del sistema endocannabinoide desempeña un papel central en el control de los niveles de ansiedad basal y en la modulación de las respuestas de miedo (Lafenêtre, Chaouloff y Marsicano, 2007).

#### *1.1.4.- Cannabinoides y conducta.*

El sistema cannabinoide se ha visto implicado en un amplio conjunto de áreas dentro del organismo, siendo importante destacar el papel que ejerce en la conducta, y más en concreto, en los aspectos motores y refuerzo.

##### *1.1.4.1.- Cannabinoides y conducta motora.*

La capacidad de las sustancias con actividad cannabinoide y su influencia en áreas motoras y en el rendimiento cognitivo, está bien documentado. En este sentido, la administración de cannabinoides en animales de experimentación, se ve acompañada de profundos efectos sobre el comportamiento motor, incluyendo catalepsia, disminución de la actividad motora y la atenuación de la hiperactividad inducida por anfetaminas y estereotipias (Giuffrida y Piomelli, 2000).

En los seres humanos, la intoxicación por marihuana causa deterioro en actividades que conllevan el control de psicomotricidad fina (seguimiento de un punto en movimiento en una pantalla con un lápiz o rendimiento de la conducción en simuladores de vuelo). Por otra parte, las sustancias cannabinoides producen un amplio espectro de efectos psicotrópicos, incluyendo euforia, déficit en la memoria de trabajo y alteración de la percepción del espacio/temporal (Giuffrida y Piomelli, 2000).

Los efectos psicomotores de los agonistas cannabinoides pueden estar mediados por las interacciones funcionales entre los sistemas endocannabinoide y dopaminérgicos (Moreno, *et al.*, 2005). Una de las características farmacológicas, de importantes sustancias que actúan sobre los receptores cannabinoides, y principalmente sobre CB1,

---

en el cerebro, es la inducción de alteraciones en el comportamiento motor (Rodríguez de Fonseca, *et al.*, 1998; Giuffrida y Piomelli, 2000).

Catalepsia, inmovilidad, ataxia son algunas de las conductas que se observan tras la administración aguda de cualquiera de los agonistas de los receptores cannabinoides naturales y sintéticos o el ligando endógeno CB1, anandamida (Rodríguez de Fonseca, *et al.*, 1998). Ensayos clínicos han demostrado que los agonistas de los receptores CB1, son capaces de atenuar las discinesias inducidas por agonistas dopaminérgicos en la enfermedad de Parkinson y en los tics de la enfermedad de *Tourette* (Moreno, *et al.*, 2005).

La presencia de los receptores CB1 en el cerebelo y en los ganglios basales, especialmente en los núcleos de salida (sustancia negra y el segmento interno del globo pálido), apoya la existencia de un sistema cannabinoide endógeno que regula la actividad motora (Rodríguez de Fonseca, *et al.*, 1998; Giuffrida y Piomelli, 2000). Sistema que funcionaría como una señal de *feedback*, del control de la facilitación de la conducta motora inducida por la dopamina (Gorriti, *et al.*, 2005). De acuerdo con algunos estudios realizados por Gorriti, *et al.*, (2005), los resultados obtenidos apoyaron el papel que existe, para el sistema cannabinoide endógeno, como una señal de retroalimentación, que controla las respuestas neurobiológicas mediadas por los receptores D2/D3, incluyendo la locomoción, el comportamiento de rotación, la reducción de acinesia en el modelo de rata tratados con reserpina de la enfermedad de Parkinson o el control de la liberación de prolactina (Gorriti, *et al.*, 2005).

#### 1.1.4.2.- Cannabinoides y procesos de refuerzo.

Varios estudios apoyan la idea de que el sistema endocannabinoide representa una nueva estructura para el control de las propiedades reforzantes de drogas. De hecho, los receptores cannabinoides CB1, son abundantes en el circuito de recompensa del cerebro y participan en las propiedades adictivas inducidas por diferentes drogas de abuso (Maldonado, Valverde y Berrendero, 2006).

Las neuronas dopaminérgicas de la vía mesocorticolímbica son controladas por señales excitatorias e inhibitorias, moduladas por los receptores CB1. Por lo tanto, los endocannabinoides pueden ser liberados tras la despolarización en el Núcleo accumbens (Nac) y de las neuronas dopaminérgicas del ATV, modulando estas las aferencias glutamatérgicas y GABAérgicas, actuando como mensajeros retrógrados en los receptores CB1 (Maldonado, Valverde y Berrendero, 2006).

---

Actualmente, se acepta que los endocannabinoides, actúan como moléculas de señalización retrógrada de plasticidad sináptica a corto plazo, mediante la activación de los receptores CB1, un hecho que puede tener importantes consecuencias en los procesos de recompensa y memoria (Pazos, *et al.*, 2005). Los endocannabinoides participan en la plasticidad sináptica dentro del sistema mesolímbico. La estimulación de aferencias de la corteza prefrontal causa depresión a largo plazo (DLP) de sinapsis glutamatérgicas en el Nac, mediada por la liberación de endocannabinoides y receptores presinápticos CB1 (Maldonado, Valverde y Berrendero, 2006).

En este sentido, es importante destacar que el sistema endocannabinoide es funcional en los circuitos relacionados con el abuso de drogas. Así, podemos destacar el papel de las neuronas dopaminérgicas a nivel mesolímbico, que proyectan del ATV hacia el núcleo accumbens y estriado ventral y dorsal, junto con las entradas glutamatérgicas de la corteza prefrontal medial (Moreira y Lutz, 2008).

Los endocannabinoides también producen depresión a largo plazo de la transmisión sináptica inhibitoria en el hipocampo y prepara las sinapsis excitatorias, facilitando la subsiguiente inducción de la potenciación a largo plazo, lo que contribuye a los mecanismos de plasticidad dados en los procesos de aprendizaje relacionados con la conducta adictiva (Pazos, *et al.*, 2005; Maldonado, Valverde y Berrendero, 2006).

El abuso de sustancias, puede inducir iniciales estados hedónicos, aunque con el desarrollo de la adicción, la administración posterior puede representar un alivio de la aversión (síndrome de abstinencia), en lugar de placer. Esto puede ser debido a una modificación en el *punto de ajuste hedónico*, secundario a los efectos crónicos de estas drogas (Moreira y Lutz, 2008).

Los cannabinoides pueden aumentar la liberación de dopamina, inducir preferencia de lugar condicionado, elemento de refuerzo a la auto-administración, disminución del umbral de auto-estimulación intracraneal y provocar el síndrome de tolerancia y abstinencia. Según diferentes grupos de investigación, se ha observado que el sistema endocannabinoide está implicado en los efectos relacionados con las propiedades reforzantes de algunas drogas de abuso, alcohol, nicotina, 3,4-metilenodioxymethamphetamine (MDMA) y cocaína (Lesscher, *et al.*, 2005).

---

Los cannabinoides parecen interferir con otros sistemas de neurotransmisión, no sólo el dopaminérgico, sino también el glutamatérgico, GABAérgico y el sistema opioide endógeno (Moreira y Lutz, 2008; Fernández-Ruiz, Hernández y Ramos, 2010). Aunque los modelos animales utilizados en la actualidad definen ligeramente las características complejas de las conductas adictivas, parecen estar cerca de los aspectos específicos, tales como las propiedades reforzantes de las sustancias, el recuerdo asociado al contexto del consumo de la droga y las consecuencias crónicas de la administración y la retirada. Por lo tanto, con estos modelos, es posible investigar si la administración de cannabinoides es realmente *satisfactoria* (Moreira y Lutz, 2008). En este sentido, se puede hablar del fenómeno conductual *sensibilización conductual*.

La sensibilización se presenta en dos estadios, denominados inducción y expresión (Pierce, *et al.*, 1997; Brenhouse, *et al.*, 2006). La *inducción* de la sensibilización está definida como la secuencia transitoria de eventos moleculares y celulares activados por la administración de psicoestimulantes, que llevan a fijar los cambios en la función neuronal. La *expresión* es la manifestación de las alteraciones celulares a largo plazo, que surgen de la fase de inducción y directamente por la respuesta comportamental aumentada (Pierce, *et al.*, 1997).

La sensibilización se basa en la hipótesis de que, la necesidad extrema, asociada con el abuso de drogas, puede llevar a la recaída después de un período de abstinencia (Steketee, 2003). De esta forma, la sensibilización, o tolerancia inversa, es la mejor respuesta a un estímulo que se produce con la exposición repetida a ese estímulo. Existen varios ejemplos de sensibilización en el sistema nervioso, como la potenciación a largo plazo (LTP) (Steketee, 2003).

## 1.2. Oleiletanolamida (OEA).

Las N-aciletanolamidas (Naes) son un grupo de mediadores lipídicos, sintetizados en respuesta a una serie de estímulos fisiológicos y patológicos (Rodríguez de Fonseca, 2004; Skonberg, *et al.*, 2010). Su naturaleza lipídica le otorga una función autocrina, y se generan a partir de un precursor de los fosfolípidos de la membrana, la N-acilfosfatidiletanolamida (NAPE) (Rodríguez de Fonseca, 2004; Borrelli y Izzo, 2009; Godlewski, *et al.*, 2009; Petersen, *et al.*, 2009; Hansen, 2010). Las aciletanolamidas incluyen al endocannabinoide anandamida (AEA), a la

---

palmitoiletanolamida (PEA), y a la oleilamida y la oleiletanolamida (OEA) (Rodríguez de Fonseca, 2004; Petersen, *et al.*, 2009; Hansen, 2010).

En esta familia se incluyen una serie de moléculas que mantienen mayor afinidad por receptores cannabinoides y aciletanolamidas, y otros, cuya afinidad se relaciona con receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas subtipo  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) y vanilloides tipo-1 (TRPV1), por lo que no son considerados cannabinoides como tal (Rodríguez de Fonseca, 2004).

La OEA es un aciletanolamida relacionada con el endocannabinoide AEA, que actúa como un agonista natural del receptor PPAR $\alpha$ . Tanto OEA como PPAR $\alpha$  se encuentran en varias estructuras del cerebro, pero su papel en el comportamiento siguen siendo desconocido. Trabajos previos han demostrado la capacidad de la OEA para regular la saciedad y el peso corporal implicando PPAR $\alpha$  no sólo en los efectos metabólicos de la OEA sino también en aspectos comportamentales (Rodríguez de Fonseca, 2004).

La OEA, agonista de PPAR $\alpha$  y antagonista de los receptores TRPV1, tiene efectos inhibidores de la ingesta generando su influencia a través del sistema nervioso autónomo. A diferencia de otras aciletanolamidas como la AEA, la OEA no muestra afinidad por los receptores cannabinoides identificados hasta la fecha, aunque recientemente, se ha descrito que la OEA es un ligando endógeno del receptor, activado por PPAR $\alpha$  (Rodríguez de Fonseca, 2001, 2004; Galán-Rodríguez, *et al.*, 2009; Plaza-Zabala, *et al.*, 2010).

Oleoiletanolamida (OEA) es un aciletanolamida que actúa como agonista de los receptores nucleares PPAR $\alpha$  para ejercer sus funciones biológicas incluyendo la regulación del apetito y el metabolismo (Fu, *et al.*, 2003; Guzmán, *et al.*, 2004; Rodríguez de Fonseca, *et al.*, 2001). También se centra en el subtipo del receptor de potencial transitorio vaniloide tipo 1 (TRPV1) (Almasi, *et al.*, 2008) y se cree que puede activar el receptor GPR119 huérfano (Overton, *et al.*, 2006). Periféricamente, la activación de PPAR $\alpha$ , ya sea OEA o su análogo palmitoiletanolamida (PEA) tiene efectos en el control del apetito, lipólisis, inflamación y dolor (Fu, *et al.*, 2003; Fu, *et al.*, 2005; Guzmán, *et al.*, 2004; Lo Verme, *et al.*, 2005; Suardiaz, *et al.*, 2007). Además, se ha demostrado que la OEA tiene propiedades neuroprotectoras, tanto *in vitro* como *in vivo*, en modelos de neurotoxicidad (Galán-Rodríguez, *et al.*, 2009) y de isquemia cerebral (Sun, *et al.*, 2007). También tiene acciones citoprotectoras sobre las

---



células beta del páncreas (Stone, *et al.*, 2011). En cuanto a las acciones centrales del sistema nervioso, se ha encontrado que la OEA puede modular el apetito a través de la regulación de varios neuropéptidos hipotalámicos implicados en la homeostasis de la energía, incluyendo la oxitocina (Gaetani, *et al.*, 2011; Serrano, *et al.*, 2011). Asimismo, se ha observado como la OEA también mejora la consolidación de la memoria a través de sus acciones en los *inputs* noradrenérgico en la amígdala (Campolongo, *et al.*, 2009; Mazzola, *et al.*, 2009) (ver figura 2).

A pesar de estas múltiples funciones fisiológicas, cada vez hay más evidencias que sugieren que la OEA podría participar en el control en la base de conductas de recompensa. La OEA está relacionada estructuralmente con los endocannabinoides, los transmisores lípidicos que regulan las conductas de recompensa (Maldonado, *et al.*, 2006) a través de sus acciones sobre los receptores cannabinoides tipo 1 (CB1) y 2 (CB2) (Di Marzo, *et al.*, 2004; Howlett, 2002). Sin embargo la OEA no se une ni activa los receptores cannabinoides, pero es el ligando endógeno de los receptores PPAR $\alpha$ . Esto podría ser un objetivo convergente con los cannabinoides, ya que estos compuestos pueden activar PPAR $\alpha$ . Genes regulados por las isoformas de PPAR $\alpha$  participan en los procesos fisiológicos básicos como la homeostasis de los lípidos, la adipogénesis, la respuesta inflamatoria, la reparación de heridas, la proliferación, diferenciación, muerte celular y carcinogénesis (Berger, *et al.*, 2005; Escher y Wahli, 2000). Esta posible relación se ha establecido por el uso de inhibidores de las enzimas implicadas en ambos, OEA y degradación de los endocannabinoides.

Por lo tanto, la inhibición de FAAH que mejora la biodisponibilidad de la OEA y endocannabinoides, bloquea la activación inducida por la nicotina de las neuronas en el tanto en el núcleo accumbens de concha y el ATV (Luchicchi, *et al.*, 2011). Estas acciones están mediadas por los receptores cannabinoides y PPAR $\alpha$ , ya que son mimetizados por agonistas del receptor PPAR $\alpha$ , que también modulan la recompensa de la nicotina (Mascia, *et al.*, 2011).

La sensibilización conductual (SC) (Schenk y Partridge, 1997) y el condicionamiento de lugar preferencial (CLP) (Roux, *et al.*, 2003) son dos modelos de estudio utilizados para la investigación de las acciones de abuso de drogas en los procesos adictivos. La sensibilización es una respuesta típica del comportamiento, asociado a los cambios adaptativos producidos por el tratamiento crónico con psicoestimulantes. Ha estado directamente relacionado con la búsqueda de drogas y el

---

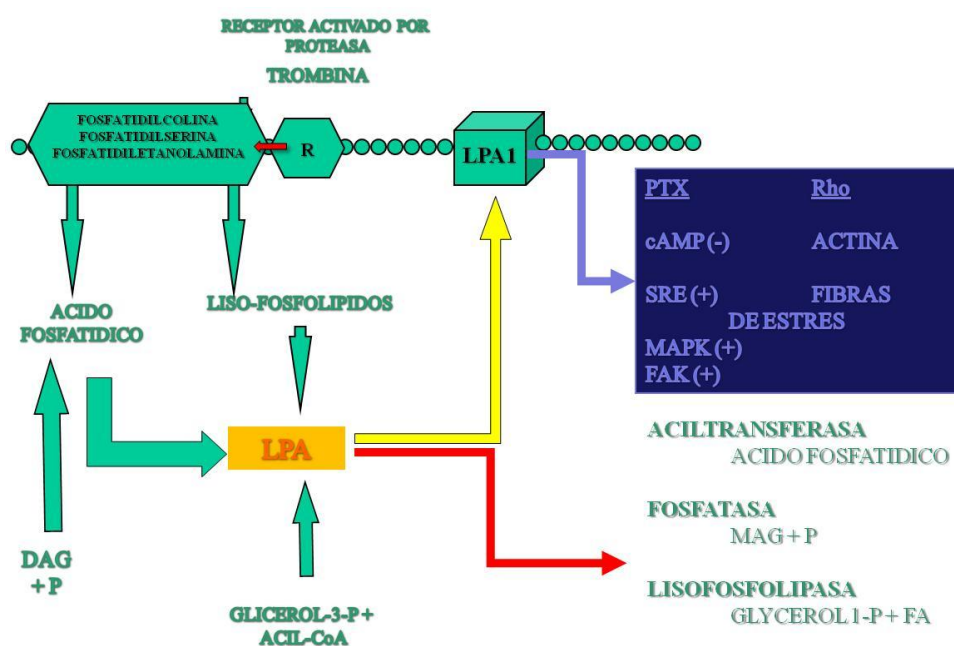
restablecimiento de la conducta. En este modelo, los efectos de los cannabinoides naturales y endógenos y el papel de los receptores cannabinoides han sido ampliamente descritos (Martin, *et al.*, 2000). La cocaína produce sensibilización normales y respuestas de recompensa en la prueba de CLP en ratones knockout para receptores CB1 (Martin, *et al.*, 2000). Sin embargo, no hay estudios que aborden el papel de la OEA sobre las conductas mediadas por la cocaína. Sólo un estudio, (Fernández-Espejo, *et al.*, 2009) demostraron que los receptores PPAR $\alpha$  no son necesarios para la inducción de la sensibilización conductual.

En la presente investigación, se estudió el papel de la OEA en la modulación de la sensibilización inducida por cocaína y preferencia de lugar condicionado, y la implicación de los PPAR en la adquisición, la expresión, la extinción y el restablecimiento inducido por la administración repetida de cocaína en ratones PPAR $\alpha$ .

### 1.3. Ácido Lisofosfatídico (LPA).

El ácido lisofosfatídico (*monoacil-sn-glicerol-3-fosfato*, LPA) es un mediador de fosfolípidos que sirve como señal extracelular mediante la activación de receptores acoplados a proteínas G. es una molécula bioactiva de la familia de los fosfolípidos llamados a lisofosfolípidos que induce una variedad de respuestas biológicas en diferentes tipos de células. LPA tiene un papel funcional como mediadores para los diferentes eventos de desarrollo y procesos fisiológicos de los mamíferos adultos (Anliker y Chun, 2004; Moolenaar, 1999; Mutoh y Chun, 2008).

Desde hace más de 10 años, Chun, *et al.*, (1999) comenzó a identificar la subfamilia de receptores lisofosfolípidicos (Chun, *et al.*, 1999; Hecht, *et al.*, 1996; Zhang, *et al.*, 1999), en la actualidad más de cinco de estos receptores han sido bien caracterizados (Anliker y Chun, 2004; Chun, 2005; Ishii, *et al.*, 2004; Lee, *et al.*, 2007; Lee, *et al.*, 2006; Mutoh y Chun, 2008; Noguchi, *et al.*, 2009). LPA activa múltiples vías de transducción de señales con posibles repercusiones en diversos procesos como en el desarrollo cerebral, el remodelado vascular y la cicatrización del tejido. La activación de GTPasas ayuda a explicar los efectos LPA sobre el control de la formación de la actina en el citoesqueleto en respuesta a los cambios extracelulares. Algunos de estos cambios podrían tener impacto en la remodelación sináptica y afectar así a la plasticidad neuronal y procesos de memoria (Moolenaar, *et al.*, 2004) (figura 5).



**Figura 5.** Representación esquemática de la producción, señalización y degradación de LPA.

Estudios recientes de nuestro grupo han demostrado que receptores LPA pueden desarrollar un papel esencial en la neurogénesis en el cerebro de ratón. Los ratones KO-LPA<sub>1</sub> (variante KO-maLPA<sub>1</sub>) mostraban una zona ventricular reducida, marcadores neuronales alterados y el aumento de muerte celular que se traduce en una pérdida de densidad de las células corticales durante la formación de la corteza cerebral (Estivill-Torres, *et al.*, 2008). En las regiones relacionadas, tales como la formación del hipocampo, el giro dentado mostró dificultades en todos los procesos de proliferación y diferenciación para la supervivencia dentro de la neurogénesis cerebral en el ratón adulto en condiciones normales o tras enriquecimiento ambiental (Matas-Rico, *et al.*, 2008). Neuronas del hipocampo adulto, en concreto de la zona subgranular de la circunvolución dentada, parecen ser necesarios para la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria, por lo que el déficit del receptor LPA<sub>1</sub> interfiere con estos procesos.

Estudios de conducta realizados en estos animales mostraron que tras evaluar las funciones de LPA<sub>1</sub> en la actividad sensorial, emocional y áreas cognitivas en ratones adultos, los animales KO-maLPA<sub>1</sub>, exhibieron deficiencias en la retención de la memoria espacial y el uso anormal de las estrategias de orientación de búsqueda (Santín, *et al.*, 2009), memoria de trabajo y de referencia defectuosa de forma

independiente de las deficiencias de exploración y emocional atribuido a un mal funcionamiento del hipocampo (Castilla-Ortega, *et al.*, 2010). Otros resultados han mostrado deterioro en respuesta de la inhibición prepulso en ratones KO-LPA<sub>1</sub>. Animales KO-LPA<sub>1</sub> muestran una disminución de la capacidad para filtrar la estimulación auditiva irrelevante, lo que puede conducir al desarrollo de los déficits cognitivos (Harrison, *et al.*, 2003; Roberts, *et al.*, 2005) y psicosis similares a la esquizofrenia (Desbonnet, *et al.*, 2009).

La relación entre el receptor LPA<sub>1</sub> y su influencia en los estados neuropatológicos, podría estar relacionado con las funciones del receptor LPA<sub>1</sub> en la generación/control de comportamientos relacionados con la ansiedad, aprendizaje y alteraciones de memoria.

## **2. Cocaína y comportamiento.**

### **2.1. Neurobiología de la cocaína.**

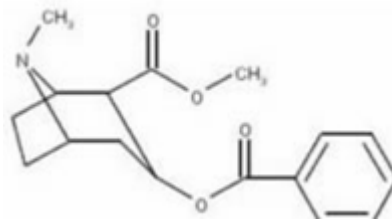
Los psicoestimulantes son sustancias capaces de reducir los umbrales de alerta o de vigilia, de modo que el individuo responde con más facilidad o prontitud a los estímulos exógenos o endógenos. La importancia de la drogadicción a psicoestimulantes en el mundo lo pone de manifiesto el informe de la Organización de las Naciones Unidas de 2005 sobre consumo de drogas (Fernández-Espejo, 2006).

Hay diversos tipos de psicoestimulantes, que se clasifican en tres grandes familias: *anfetamínicos*, *alcaloides naturales* y *metilxantinas*. Tanto la anfetamina como la cocaína, producen efectos similares sobre el estado de ánimo, provocan toxicidad crónica y poseen un alto potencial de abuso y dependencia (Fernández-Espejo, 2006).

La cocaína (*benzoilmetil ecgonina* C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>), es un estimulante neuropsicológico que reduce la somnolencia, incrementa el estado de alerta y facilita la concentración. Deriva de un arbusto, el *Erythroxylon coca*, planta nativa de los Andes y del este de Sudamérica (Fernández-Espejo, 2006). Fue usada por los indios andinos durante cientos de años, los cuales masticaban las hojas de coca para disminuir los síntomas asociados a la vida en altas altitudes (vértigo y náuseas). Mediante la masticación, los niveles de cocaína en sangre son muy bajos, de manera que incluso después de años de uso, es raro encontrar restos de cocaína en estos indios. Por tanto, la toxicidad de este psicoestimulante tiende a ser muy baja (Holmstedt, *et al.*, 1979).

---

La cocaína es una base débil (pKa: 8.6) que atraviesa rápidamente las membranas corporales (incluidas las placentarias y las hematoencefálicas) (figura 6).



**Figura 6.** Estructura química de la cocaína.

La absorción, los picos plasmáticos, la biodisponibilidad y las concentraciones alcanzadas tras el consumo, dependen de la forma de presentación farmacológica y de la vía utilizada (Caballero, 2005). El consumo por vía nasal del clorhidrato de cocaína produce efectos en pocos minutos (con un pico a los 20-30 minutos), que desaparecen completamente a los 60 minutos (aunque pueden permanecer más si el efecto vasoconstrictor de la mucosa lentifica la absorción). Por vía intranasal la biodisponibilidad de la cocaína nunca supera el 40%. Las formas fumadas tienen mecanismos de acción más rápidos (llegan a actuar en segundos), menos duraderas (por ello predisponen más al consumo compulsivo) y tienen una biodisponibilidad más irregular. La vía intravenosa es también muy rápida y proporciona una biodisponibilidad completa de la cocaína inyectada (100%) (Lizasoain, Moro y Lorenzo, 2001; Bobes, Saiz, González, Bascarán, 2001; Roncero, Ramos, Collazos y Casas, 2001; Caballero, 2005).

La cocaína inhibe específicamente al transportador de monoaminas de la membrana neuronal presináptica, impidiendo con ello la recaptación de los neurotransmisores (especialmente de la dopamina, pero también de la serotonina y la noradrenalina). Como consecuencia, la concentración de estas sustancias se incrementa en el espacio sináptico, facilitándose su unión a los receptores y aumentando de forma muy intensa su acción fisiológica (Caballero, 2005).

A nivel del Sistema Nervioso Periférico (SNP) la cocaína tiene acción *anestésica*. En este sentido, este psicoestimulante se ha utilizado en medicina, como agente anestésico local vasoconstrictor, lo que supuso beneficios en la cirugía de nariz, oreja y garganta. La dosis máxima de seguridad permitida es de 3 mg/kg. Pero su uso declinó debido al marcado incremento de investigaciones que relacionaban la cocaína con determinadas tasas de mortalidad y toxicidad (Fernández-Espejo, 2006).

Sobre el SNC la cocaína tiene acciones estimulantes, incrementando la concentración de dopamina en los centros de recompensa cerebrales (Fernández-Espejo, 2006). Los efectos reforzadores positivos, la euforia y la dependencia de cocaína, se explican por su acción en los circuitos cerebrales de recompensa, a través del aumento de la concentración de dopamina en el núcleo accumbens y su interacción con los receptores postsinápticos (Caballero, 2005).

Las drogas de abuso, como la cocaína, producen una respuesta estimulante que aumenta con la exposición repetida intermitente de la misma (Steketee, 2005). Desde tiempo atrás, los objetivos de las investigaciones se han centrado, principalmente, en el sistema dopaminérgico mesolímbico, en el ATV que inerva numerosas estructuras límbicas como el núcleo accumbens (Steketee, 2005). El ATV desempeña un papel crucial en la sensibilización inducida por el consumo crónico de drogas, en especial de los psicoestimulantes (Corominas, Roncero, Bruguera y Casas, 2007). En este sentido, los datos apoyan la idea de que el ATV juega un papel en el inicio de la sensibilización, mientras que el núcleo accumbens desempeña un papel en la expresión de la sensibilización (Steketee, 2005).

La dopamina, a nivel mesolímbico, es el neurotransmisor crucial en el aprendizaje apetitivo instrumental. Durante el consumo crónico se produce una situación bifásica en la liberación de dopamina. Por un lado, en el momento del consumo tiene lugar un aumento de los niveles de dopamina extracelular, por otra parte, al finalizar el consumo, se manifiesta una disminución de la liberación endógena de dopamina (Steketee, 2005).

La hipofunción dopaminérgica endógena se ha observado durante la abstinencia de las distintas drogas de abuso, cocaína, morfina, alcohol y nicotina, y afectando de manera especial al estriado ventral. Durante la abstinencia, la hipofuncionalidad dopaminérgica se asocia a cambios neuroadaptativos que afectan, principalmente, a los circuitos de la recompensa (Corominas, Roncero, Bruguera y Casas, 2007).

Aunque el neurotransmisor principal y más estudiado en la regulación y acción de los efectos reforzantes de la cocaína sea la dopamina, estudios actuales implican a otros neurotransmisores en la actividad de la cocaína (Caballero, 2005; Fernández-Ruiz, Hernández y Ramos, 2010). En este sentido, los efectos de la cocaína no son completamente evitados, tras la administración de antagonistas dopaminérgicos, pudiendo tener también la acción serotoninérgica, un papel en el potencial de abuso de

---

la cocaína (Caballero, 2005). Por otro lado, estudios recientes demuestran la implicación del principal neurotransmisor excitatorio, el glutamato, en las acciones de la cocaína.

Las principales áreas y mecanismos cerebrales implicados en el proceso de adicción a la cocaína, son comunes para todas las sustancias que pueden generar adicción. La cocaína produce euforia, porque aumenta la actividad dopaminérgica en el cerebro, particularmente en el área tegmental ventral o anterior y en el Nac, es decir, en las principales áreas del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, que constituyen los centros de la recompensa del SNC. Asimismo, la cocaína, incrementa la actividad glutamatérgica en el núcleo acumbens, el área tegmental ventral o anterior, el núcleo estriado y la corteza cerebral prefrontal.

## **2.2. Cocaína y sensibilización conductual.**

Desde un punto de vista bioquímico, la exposición crónica a cocaína, produce adaptaciones en regiones específicas del cerebro, que median la activación de las propiedades de estas drogas. El sistema mesolímbico es el sistema más importante que interviene en estas adaptaciones, comprendiendo las neuronas dopaminérgicas en el ATV y sus proyecciones para el prosencéfalo límbico, como el Nac.

Se conocen estudios sobre la sensibilización conductual a la cocaína desde 1932, con dedicación a la determinación de los mecanismos que la producen. La sensibilización se presenta en dos estadios, denominados inducción y expresión (Pierce, *et al.*, 1997; Brenhouse, *et al.*, 2006).

La sensibilización se basa en la hipótesis de que, la necesidad extrema, asociada con el abuso de drogas, puede llevar a la recaída después de un período de abstinencia (Steketee, 2003). De ahí que, la sensibilización, podría definirse como el proceso contrario a la tolerancia, es decir, el aumento de la respuesta a una droga, que sigue su presentación de forma intermitente y repetida (Steketee, 2003; Tanda, 2007). De esta forma, la sensibilización, o tolerancia inversa, es la mejor respuesta a un estímulo que se produce con la exposición repetida a ese estímulo. Existen varios ejemplos de sensibilización en el sistema nervioso, como la potenciación a largo plazo (LTP) (Steketee, 2003).

---



La *inducción* de la sensibilización está definida como la secuencia transitoria de eventos moleculares y celulares activados por la administración de psicoestimulantes, que llevan a fijar los cambios en la función neuronal. La *expresión* es la manifestación de las alteraciones celulares a largo plazo, que surgen de la fase de inducción y directamente por la respuesta comportamental aumentada (Pierce, *et al.*, 1997). La inducción parece ocurrir durante la administración repetida de la droga y posiblemente, con una duración de uno o dos días, desde que la administración haya cesado. Por otro lado, los cambios que son vistos semanas después del cese del tratamiento, están asociados con la expresión.

La mayoría de las drogas de abuso, incluyendo cocaína, anfetaminas, opiáceos, etanol, nicotina... se han visto confirmadas como capaces de producir sensibilización tras su exposición repetida. En el caso de las drogas de abuso, la sensibilización se manifiesta como una respuesta de comportamiento mejorado y se cree que subyacen a los procesos asociados con la adicción. En este sentido, se ha observado que existen mecanismos similares, que pueden ser la base del desarrollo de la sensibilización inducida por drogas, como los implicados en la LTP (Steketee, 2003). Estos procesos neuroadaptativos pueden persistir tiempo después de la administración y eliminación de la droga en el cerebro (Koob y Nestler, 1997; Steketee, 2005; Mattson, *et al.*, 2008).

La exposición repetida a drogas de abuso da lugar a un aumento progresivo y duradero en el efecto motor, fenómeno de sensibilización conductual, que puede considerarse en la base de ciertos aspectos de la adicción a las drogas. Esta sensibilización, como ya se ha expresado anteriormente, es la consecuencia de los cambios neuroadaptativos inducidos por las drogas, en un circuito dopaminérgico y con la participación de las interconexiones glutamatérgicas entre el ATV, núcleo accumbens, corteza prefrontal y la amígdala (Vanderschuren y Kalivas, 2000; Steketee, 2003; Steketee, 2005; Gerdeman, 2007; Fernández-Espejo, *et al.*, 2009). Algunos estudios expresan que los sustratos comunes en la sensibilización inducida por drogas, adquiere importancia la transmisión de glutamato, en especial en el receptor NMDA y su acción sobre el ATV (Vanderschuren y Kalivas, 2000).

Aunque la transmisión de dopamina se asocia con una mayor sensibilización para anfetamina, cocaína y  $\mu$ -opioides, se ha identificado un papel importante para el glutamato, sólo con la sensibilización inducida por cocaína. Las regiones corticales glutamatérgicas, como la corteza prefrontal parecen más influyentes para la

---



sensibilización inducida por cocaína (Vanderschuren y Kalivas, 2000; Blanco, *et al.*, 2012).

En este sentido, Vanderschuren y Kalivas (2000) en su estudio, señalan que las diferencias entre diferentes drogas, en los procesos de inducción y expresión de sensibilización, indican que la sensibilización conductual puede surgir de neuroadaptaciones en múltiples núcleos cerebrales. Esto no sólo se debería al resultado de distintas dianas moleculares de las drogas, sino que también puede incluir la implicación de las diferentes asociaciones aprendidas. Estos autores concluyen que, la capacidad farmacológica relativamente más sólida de la anfetamina, para la liberación de dopamina, puede inducir una forma de sensibilización, más dependientes de las adaptaciones en la transmisión dopaminérgica, a nivel del núcleo accumbens, que con la sensibilización inducida por cocaína y morfina (Vanderschuren y Kalivas, 2000).

Estudios recientes han comenzado a examinar el papel específico de los receptores de dopamina en el córtex prefrontal medial, en el desarrollo de la sensibilización a los psicoestimulantes. La inyección de un agonista de receptores D<sub>2</sub>-like, quinpirole, dosis-dependiente en el córtex prefrontal medial, bloquea la respuesta motora estimulante aguda de la cocaína. Estos efectos de quinpirole estuvieron determinados por la co-administración de un antagonista D<sub>2</sub>, sulpiride, que bloquea los efectos de quinpirole, mientras que la administración de un agonista D<sub>4</sub>, PD 168,077, no mimetizó los efectos de quinpirole. Así, mientras que los receptores D<sub>2</sub> en la corteza prefrontal medial (CPM), parecen estar implicados en la respuesta estimulante aguda motora de la cocaína, los receptores D<sub>1</sub>-like no lo están (Steketee, 2003).

Aunque los factores neurobiológicos son explicativos del proceso de adicción, muchos estudios, sin embargo, indican que los factores no farmacológicos, sino ambientales, sobre todo el entorno de la administración del fármaco, modulan tanto el desarrollo, como expresión de la sensibilización conductual (Mattson, *et al.*, 2008). En este sentido, Mattson, *et al.*, (2008) señalan que, por ejemplo, la administración repetida de cocaína produce, normalmente, mayor sensibilización locomotora, cuando el fármaco se administra en un ambiente nuevo y no en la jaula del animal.

Se ha sugerido que la sensibilización inducida por drogas de abuso, se podría deber a adaptaciones neuronales que desempeñan un papel en el desarrollo de conductas adictivas. La sensibilización conductual se ha demostrado fácilmente en animales, y se

---

ha hipotetizado con que esta adaptación, esté involucrada en la transición del uso de drogas de abuso y la adicción (Tanda, 2007).

Puede entenderse por tanto que, la sensibilización conductual haya sido objeto de diferentes estudios en busca de terapia farmacológica capaz de transformar o reducir los efectos de esta adaptación, inducida por la administración sub-crónica o crónica de psicoestimulantes en general y de la cocaína en particular.

### **2.3. Cocaína y condicionamientos contextuales.**

#### *2.3.1. Locomoción condicionada.*

La Locomoción Condicionada (LC) se encuentra dentro de la prueba conocida como Sensibilización Conductual (SC). La LC, en si misma, se puede entender como la inducción de respuestas contextuales asociadas a la administración de cocaína y que se manifiestan como un incremento en la actividad locomotora del animal al ubicarlo en un espacio-ambiente asociado a la administración de cocaína. La LC va unida a la sensibilización, El proceso de sensibilización se considera una respuesta comportamental o fisiológica incrementada como resultado de una sobreestimulación previa de circuitos neurales involucrados en dicha respuesta.

Por ejemplo, el tratamiento con drogas de abuso como la cocaína o anfetaminas induce un incremento en la locomoción de un individuo. El tratamiento repetido con dichas drogas puede producir sensibilización de la respuesta de locomoción, la cual se observa tras un período de abstinencia, cuando se trata de nuevo a los individuos con dosis menores a las anteriores, pero la respuesta locomotora es mayor que en individuos control que no recibieron la droga con anterioridad (Coria-Ávila, *et al.*, 2008).

Los animales que se condicionan durante una serie de días con drogas de abuso, como la cocaína, muestran un aumento significativo de la distancia recorrida durante la duración del test (aproximadamente 30 minutos), con respecto a los animales que se condicionan con vehículo. Es decir, los animales que recibieron un tratamiento crónico con cocaína muestran una respuesta similar a la que hubieran mostrado de haber recibido una dosis de cocaína. Es importante recordar que esta respuesta es un condicionamiento contextual que supone el reconocer un espacio (contexto) asociado a la cocaína, y por tanto supone la participación de circuitos de memoria explícita de base hipocampal. En este sentido, la locomoción condicionada por contexto se entiende que tiene naturaleza episódica y una base hipocampal.

---

### 2.3.2. Preferencia de lugar.

La prueba conocida como Condicionamiento de Lugar Preferencial o de aversión, conocido comúnmente por sus siglas en inglés (Conditioned Place Preference, CPP), es un método conductual capaz de medir las propiedades afectivas (positivo, neutral o negativo) de las drogas psicoactivas, siendo, además una medida de uso general de los incentivos positivos aprendizaje (Solinas, Yasar y Goldberg, 2007; Fattore, *et al.*, 2007; Tanda, 2007). El Condicionamiento de Lugar Preferencial (CLP) se utiliza en la evaluación de las propiedades motivacionales de diferentes sustancias (Tanda, 2007). Consiste en la asociación repetida entre las propiedades principales de un estímulo incondicionado (drogas), con un ambiente distinto y un estímulo neutro (solución salina o vehículo) con un segundo entorno. Después de una serie de este tipo de asociaciones, durante el que el estímulo no condicionado adquiere propiedades de estímulo condicionado, los animales tienen acceso a ambos contextos en un estado libre de drogas.

Con el CLP se demuestra si el animal pasa la mayor cantidad de tiempo en el compartimento de la droga o en el medio vinculado a la solución salina o vehículo. La preferencia demuestra que el ambiente asociado a los efectos de drogas ha adquirido propiedades de incentivos (Tanda, 2007; Fattore, *et al.*, 2007).

El CLP, sigue los principios del condicionamiento clásico, incluyendo su extinción, durante el que los animales muestran un enfoque de reducción al contexto condicionado, siguiendo a la ausencia de la droga. Sobre las bases de las formulaciones teóricas del condicionamiento pavloviano, el CLP parece reflejar una preferencia por un contexto debido a la asociación contigua entre los estímulos del contexto y las drogas. Dentro de este marco teórico, parece claro que, si bien se ha usado comúnmente para evaluar las propiedades gratificantes y las dificultades del abuso de drogas, las medidas aportadas por el CLP, son diferentes a las de la autoadministración (Fattore, *et al.*, 2007; Tanda, 2007).

El CLP se considera una medida alternativa de recompensa en animales. Sin embargo, el CLP ofrece estimación menos directa de los efectos de recompensa de las drogas de autoadministración intravenosa, no obstante tiene varias ventajas (Solinas, Yasar y Goldberg, 2007):

---

- Los animales no necesitan ser sondados, en este sentido, los animales pueden ser inyectados vía administración subcutánea e intraperitoneal.
- El tiempo de duración de los experimentos es, por lo general de una o dos semanas.

En cuanto a la evaluación de los efectos de la droga, tanto positivos (recompensa) como negativos (aversión) puede ser dentro del mismo experimento. Así, podría ser interesante con agonistas cannabinoides, donde se podrían encontrar resultados muy contrastados desde lugar preferencial positivo a ningún efecto en el compartimento de aversión (Gardner y Vorel, 1998; Solinas, Yasar y Goldberg, 2007).

Entre los primeros en estudiar el condicionamiento de lugar preferencial en la administración de THC estuvieron el grupo de Gardner, *et al.*, (1998). En sus experimentos se observó condicionamiento de lugar inducido por THC pero vieron que no dependía sólo de la dosis de THC, sino también del régimen de la administración de THC (Gardner y Vorel, 1998; Solinas, Yasar y Goldberg, 2007). Este grupo, observó que cuando las sesiones de condicionamiento se realizaban todos los días y el THC se administraba cada segundo día, las preferencias de lugar se desarrollaban en dosis de THC de 2 y 4 mg/kg, pero sin efectos a dosis de 1 mg/kg. Sin embargo, cuando se realizaba el condicionamiento cada dos días y el THC se administraba cada cuatro días, las preferencias de lugar solo tenían lugar a dosis de 1 mg/kg de THC, produciendo aversiones de lugar las dosis más altas de THC (Gardner y Vorel, 1998; Solinas, Yasar y Goldberg, 2007).

Avances importantes dados en el estudio del condicionamiento de lugar preferencial vienen dados por los trabajos de Maldonado, *et al.*, (2000; 2002; 2006). Estos avances se dan tanto en la caracterización como en el entendimiento de los efectos de recompensa y aversión de los cannabinoides en ratones. Los estudios de este grupo sugieren que la primera administración de THC, incluso con una dosis baja (1 mg/kg), produce efectos de aversión que impiden el desarrollo de las siguientes preferencias lugar condicionado (Solinas, Yasar y Goldberg, 2007).

### **3. Interacciones entre endocannabinoides, dopamina y ácido lífosfatídico.**

Se ha trabajado mucho acerca del papel del sistema endocannabinoide en los procesos de recompensa del cerebro, que se cree que desempeñan un papel fundamental

---

en el desarrollo y mantenimiento del abuso de drogas y dependencia (Solinas, *et al.*, 2007). Por ejemplo, la modulación farmacológica de los ECS parece regular los efectos de recompensa mediada por dopamina de muchas drogas de abuso, incluyendo el alcohol, cannabis, opiáceos y psicoestimulantes (Colombo, *et al.*, 2005; De Vries, *et al.*, 2001; Ledent, *et al.*, 1999; Maldonado y Rodríguez de Fonseca, 2002; Scherma, *et al.*, 2008). Sin embargo, existe menos información acerca de las consecuencias comportamentales de la modulación de la señalización endocannabinoide en el control motor. Las evidencias sugieren que la regulación de aspectos psicomotores puede depender de la interacción entre los sistemas endocannabinoide y dopaminérgico en los ganglios basales y el sistema de recompensa mesolímbico (Giuffrida y Piomelli, 2000; Glass, *et al.*, 1997).

Los endocannabinoides (ECS), la anandamida (AEA) y 2-araquidonoilglicerol (2-AG), son mensajeros retrógrados que regulan una amplia variedad de funciones cerebrales mediante la estimulación de los receptores de cannabinoides tipo 1 y 2 (CB1 y CB2) (Placzek, *et al.*, 2008; Wang y Ueda, 2008). El receptor CB1 se expresa altamente en los terminales de los axones de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas que se proyectan en el sistema cannabinoide endógeno controlando la liberación de neurotransmisores y la plasticidad sináptica (Adermark y Lovinger, 2007; Adermark, *et al.*, 2009; Gerdeman y Lovinger, 2001; Piomelli, 2003). Debido a la presencia anatómica en los circuitos de los ganglios basales (Martin, *et al.*, 2008; Rodríguez de Fonseca, *et al.*, 1998), una de las principales funciones de los endocannabinoides en el sistema nervioso central se relaciona con la regulación de conductas mediada por dopamina (Rodríguez de Fonseca, *et al.*, 2001; Solinas, *et al.*, 2008). Incluyen control de áreas motoras (Giuffrida, *et al.*, 1999; Rodríguez de Fonseca, *et al.*, 1998; Solinas, *et al.*, 2007), respuestas motivacionales y emocionales (Luchicchi, *et al.*, 2010; Solinas, *et al.*, 2007) y procesos cognitivos en condiciones normales y patológicas (Giuffrida, *et al.*, 2004; Rasmussen, *et al.*, 2009).

Por ejemplo, la activación de los receptores CB1 induce la liberación de dopamina en humanos y roedores de laboratorio (Bossong, *et al.*, 2009; Ng Ton Cheong, *et al.*, 1988; O'Neill, *et al.*, 2009). Por el contrario, la activación de receptores D2 de dopamina estimula la liberación de AEA en el estriado (Giuffrida, *et al.*, 1999). En esta situación, los ECS ejercen una función de retroalimentación inhibitorios para contrarrestar la facilitación de la actividad motora inducida por dopamina (Beltrán, *et*

---

*al.*, 2000). En este sentido, trabajos anteriores han demostrado que los agonistas CB1 son capaces de actuar en discinesias (Ferrer, *et al.*, 2003), mientras los antagonista CB1 parecen agravar las estereotipias (Ferrer, *et al.*, 2007) inducidas por la sobreactivación dopaminérgica. Por otro lado, la desensibilización de los receptores CB1 inducida por la administración aguda o crónica de tetrahidrocannabinol facilita conductas mediada por dopamina (Gorriti, *et al.*, 2005; Gorriti, *et al.*, 1999).

AEA y 2-AG son generadas por células a demanda mediante estímulos dependientes de precursores de fosfolípidos de membrana y, después de la liberación, se someten a rápida desactivación biológica (Di Marzo, *et al.*, 1994; Stella, *et al.*, 1997). Ambas son degradadas y eliminadas a través de la hidrólisis enzimática por la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y monoacilglicerol lipasa (MAGL) (Cravatt, *et al.*, 2001; Cravatt, *et al.*, 1996), respectivamente.

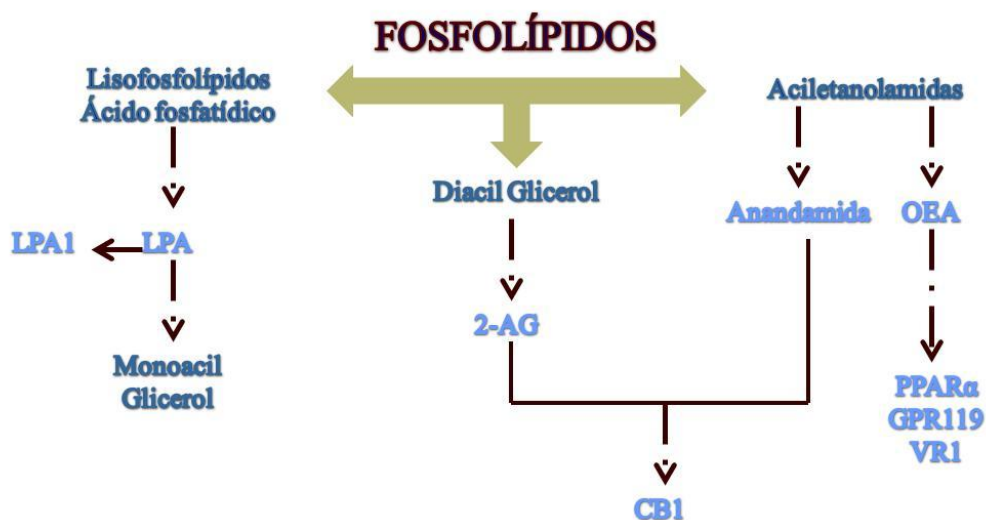
Los niveles de AEA en el estriado pueden verse aumentados debido a la administración aguda de cocaína, un efecto mediado por los receptores dopaminérgicos D2 (Arnold, 2005; Ledent, *et al.*, 1999). La cocaína actúa como un agonista indirecto dopaminérgico que puede inducir una respuesta motora aumentada después de la repetida exposición, sensibilización conductual por cocaína. De esta manera, un posible mecanismo homeostático en la hiperfunción psicomotora dopaminérgica podría ser explicada por los cambios funcionales de los receptores CB1 en las áreas cerebrales motoras. El aumento de la AEA y 2-AG en función de la actividad dopaminérgica puede servir de retroalimentación inhibitoria para contrarrestar el comportamiento motor mediada por DA (Beltrán, *et al.*, 2000; Giuffrida, *et al.*, 1999).

Si además, queremos analizar de qué forma se ven involucrados los fosfolípidos, LPA, un modelo relevante para evaluar la contribución de los receptores LPA<sub>1</sub> en la memoria y el aprendizaje es el análisis de los efectos de las drogas de abuso. La exposición crónica a drogas de abuso puede inducir cambios a largo plazo en la neuroplasticidad en varios circuitos funcionales. Estos cambios pueden ser revelados a través de análisis de comportamiento, que incluyen las respuestas condicionadas de la locomoción y la sensibilización conductual. Por ejemplo, la exposición repetida de cocaína se asocia con el desarrollo de dos tipos diferentes de respuestas de comportamiento: la locomoción condicionada (el aumento en la locomoción basal en un contexto vinculado a la administración de cocaína) y la sensibilización conductual (el aumento sobre la locomoción en el efecto de la cocaína después de la administración de

---

cocaína repetidas). Estas respuestas se creen independientes (Hotsenpiller y Wolf, 2002; Tirelli, *et al.*, 2003), y están relacionadas con la modulación dinámica de la transmisión de dopamina y el glutamato en los ganglios basales, el hipocampo y el prosencéfalo límbico (Pierce y Kalivas, 1997; Mohn, *et al.*, 2004; Rodríguez-Borrero, *et al.*, 2006; Chambers, *et al.*, 2010).

Además de estos transmisores clásicos, los mediadores lipídicos como los lisofosfolípidos están ganando lugar en las señales pertinentes que contribuyen a la neuroadaptaciones asociadas a la exposición crónica de drogas. El papel de los receptores LPA<sub>1</sub> y su interacción con la neurotransmisión sináptica glutamatérgica y dopaminérgica en las alteraciones asociadas a la exposición al fármaco quedan por determinar (figura 5).



**Figura 5.** Interacciones sistema endocannabinoide y lisofosfolípidos. El ácido lisofosfatídico puede ser precursor de 2-AG.

En el caso del ácido lisofosfatídico, su efecto sobre los receptores que regulan plasticidad sináptica, como es el caso de LPA<sub>1</sub>, y el fenotipo de los ratones carentes de este receptor, sugieren que puede jugar un papel en los procesos de aprendizaje asociativo mediados por dopamina y que subyacen a la adicción. Esta hipótesis es uno de los objetivos del presente trabajo.

## **II. PLANTEAMIENTO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---





## PLANTEAMIENTO

En la actualidad, los trastornos adictivos y sus problemas de salud derivados del uso, abuso y dependencia de drogas hacen necesario el estudio de sus posibles implicaciones terapéuticas, a fin de intervenir en los niveles de prevención y tratamiento, tratando de disminuir las consecuencias negativas que esto supone.

Es conocido el papel que, en la adicción, tiene la dopamina, neurotransmisor que en su localización y función en el sistema mesocorticolímbico, puede explicar las consecuencias a niveles motores y emocionales, que concurren con el consumo de drogas. En el sistema dopaminérgico, tras la administración crónica de agonistas, se puede estudiar el fenómeno conocido como sensibilización conductual, fenómeno de plasticidad sináptica, que tiene lugar, aproximadamente, durante un periodo de 6 meses desde el inicio del mismo y que genera una respuesta conductual mayor a lo largo del tiempo.

La exposición repetida a drogas potencialmente adictivas es capaz, en sujetos susceptibles y bajo determinadas circunstancias, de alterar de forma persistente neuronas y circuitos cerebrales, normalmente destinados a la regulación de la atribución de la saliencia a los estímulos, un proceso que se encuentra dentro del comportamiento motivado. Por medio de este fenómeno, se estudia la conducta motora y su relación con estudios de adicción, no sólo a partir de la locomoción, sino además de conductas emocionales-motivacionales, como el condicionamiento de lugar.

En el planteamiento de este trabajo, y con la realización de estudios comportamentales a partir de la sensibilización conductual sobre psicoestimulantes, se trata de analizar la influencia e interacción que, en el estudio de la adicción, tienen los sistemas de neurotransmisión como el dopaminérgico, el cannabinoide y el mediado por oleiletanolamida/receptor PPAR $\alpha$  y por último el papel del receptor LPA $_1$  para ácido lisofosfatídico. Todos estos sistemas de transmisión pueden jugar un papel importante en el establecimiento de condicionamientos inducidos por cocaína.

Al observarse que el sistema dopaminérgico está directamente implicado en la conducta motora y en respuestas emocionales y motivacionales, se intentó analizar la modulación que ejercen otros sistemas, sobre las respuestas tras la administración de agonistas dopaminérgicos.

---

## HIPÓTESIS y OBJETIVOS.

El sistema dopaminérgico ubicado en el sistema de recompensa cerebral es una de las principales dianas de drogas de abuso. Pero la generación del proceso adictivo conlleva la acción de otros neurotransmisores además de la dopamina. En este caso, la adicción a psicoestimulantes podría estar acompañada de la alteración en otros sistemas de neurotransmisión, como ciertos lípidos transmisores incluyendo endocannabinoides, oleiletanolamidas y ácido lisofosfatídico.

Para comprobar esta hipótesis experimental, se han planteado los siguientes *objetivos*:

1. Caracterizar las acciones de un agonista dopaminérgico D2/D3 (quinpirole) y de la cocaína, realizando una curva dosis-respuesta, en un modelo animal de ratón C57/BL6J, a través del estudio de la conducta motora (locomoción y estereotipias).
  2. Caracterizar las acciones de las aciletanolamidas endógenas en la interacción con el sistema dopaminérgico, administrando el agonista dopaminérgico D2/D3 quinpirole y de la cocaína sobre la modulación de la locomoción y estereotipias. Para ello se utilizaron compuestos capaces de inhibir la degradación de aciletanolamidas.
  3. Caracterizar las acciones comportamentales de la cocaína en su interacción con aciletanolamidas, sobre la vía no cannabinoide OEA-PPAR $\alpha$  en ratones C57/BL6J y KO PPAR $\alpha$ .
  4. Analizar la locomoción condicionada y la sensibilización conductual inducida por cocaína en ratones que carecen del receptor LPA $_1$ , variante Málaga (KO-maLPA $_1$ ).
-





### III. MATERIAL Y MÉTODOS

---



Para la realización de los estudios experimentales de esta tesis, se han utilizado principalmente las instalaciones del Laboratorio de Medicina Regenerativa, de la Fundación IMABIS (Instituto Mediterráneo para el Avance de la Biotecnología y la Investigación Sanitaria) en el Hospital Carlos Haya y el estabulario central de la Universidad de Málaga, situado en la Facultad de Medicina.

## 1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

En los experimentos realizados en este estudio se han utilizado ratones macho de las cepas C57Bl/6J (Charles River, Barcelona), transgénicos macho PPAR $\alpha$  -/- (Laboratorios Jackson, Bar Harbor, Maine, EEUU) y maLPA<sub>1</sub>, con un peso medio de  $25 \pm 5$  gramos (figura 1). Estos animales han sido mantenidos en el estabulario central de la Universidad de Málaga.

La particularidad de los ratones KO-maLPA<sub>1</sub> es que son una variante *Málaga* de la colonia de ratones KO-LPA<sub>1</sub>, descrito por Estivill-Torrús, *et al.* (2008), que surgió de forma espontánea a partir de la línea inicial de LPA<sub>1</sub> (Contos, *et al.*, 2000).

Los animales se mantuvieron acondicionados con un fotoperiodo día-noche de 12 horas, bajo condiciones constantes de temperatura ( $20 \pm 2$  °C) y humedad ( $40 \pm 5$  % H.R.).

Estos animales dispusieron de comida (dieta SAFE A04, Panlab, Barcelona, España) y agua *ad libitum*. Los protocolos de experimentación se llevaron a cabo de acuerdo con el Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, así como con la Directiva de la Comunidad Europea 86/609/EEC que regula la investigación animal.



**Figura 1.** Animales de experimentación: A) ratón C57/BL6J. B) ratones KO PPAR $\alpha$ . C) ratón KO-maLPA<sub>1</sub>. En esta última imagen se puede observar un notable dimorfismo craneofacial, hocico corto y ojos espaciados, características de esta cepa.



## 2. TRATAMIENTOS: Drogas.

### 2.1. Estudio 1. *Reversión de la hiperactividad inducida por los receptores de dopamina D2 mediada por los inhibidores de la degradación de endocannabinoides.*

Para llevar a cabo este estudio, se usaron diferentes compuestos asociados al sistema endocannabinoide, junto a su relación con el sistema dopaminérgico.

- Agonistas dopaminérgicos:
  - **Quinpirole.** (-) – *Quinpirole hydrochloride* (Tocris Bioscience, Cookson Ltd, UK). Es un agonista selectivo de receptores D2/D3 (0,1mg/kg y 1mg/kg). Diluido en DMSO, Tween-80 y NaCl 0,9% (1:1:8). Se administró por vía subcutánea (s.c).

Las dosis seleccionadas se tomaron en base a estudios previos que indicaron la presencia de interacciones farmacológicas entre receptores dopaminérgicos y sistema cannabinoide (Eilam y Szechtman, 1989; Giuffrida, *et al.*, 1999; Rodríguez de Fonseca, *et al.*, 1994).

Para analizar la existencia de interacciones entre el sistema cannabinoide y dopaminérgico en locomoción y la aparición de conductas estereotipadas, se usaron inhibidores de enzimas de degradación (FAAH y MAGL) de los ligandos endógenos AEA y 2-AG del sistema cannabinoide.

- **URB597:** (3'-(aminocarbonyl)[1,1'-biphenyl]-3-yl)-cyclohexylcarbamate (Cayman Chemical, Michigan, USA). Es un inhibidor selectivo de la enzima de degradación FAAH: Se usó una dosis de 1 mg/kg. Se administró por vía intraperitoneal (i.p).
- **URB602:** [1,1'-biphenyl]-3-yl-carbamic acid, cyclohexyl ester (Cayman Chemical, Michigan, USA). Es un inhibidor de la enzima de degradación MGL. Se preparó a dosis de 10 mg/kg. Administrado por vía intraperitoneal.

### 2.2. Estudio 2. *La oleoiletanolamida dosis-dependiente atenúa los comportamientos inducidos por cocaína a través de un mecanismo independiente del receptor de PPARα.*

En este estudio, se pretendió observar la asociación que existe entre el sistema endocannabinoide, a partir de agonistas no cannabinoide, en la sensibilización inducida por cocaína. Para ello, se usó un tipo de agonista no cannabinoide, OEA.

Usamos **Clorhidrato de cocaína** (Agencia Española de medicamentos y productos sanitarios, Ministerio de Sanidad y Consumo), diluida en NaCl 0,9% (suero salino), siendo administrado por vía intraperitoneal (i.p.). Se usaron dosis de 20 mg/kg, para el condicionamiento crónico y 10 mg/kg para inyecciones de sensibilización conductual, inducidas por un *priming*.

En cuanto al compuesto no cannabinoide:

- **Oleiletanolamida** (OEA): (9Z)-N-(2-Hydroxyethyl)-9-octadecenamide (Tocris Bioscience, Bristol, UK). Agonista PPAR $\alpha$  y antagonista de receptores vaniloides TPRV1. Se administraron tres tipos de dosis, 1, 5 y 20 mg/kg. Diluido en DMSO, Tween-80 al 5% en salino (1:1:8 i.p.).

### 2.3. Estudio 3. Estudio de la atenuación de la locomoción condicionada inducida por cocaína en la expresión de receptores de glutamato del hipocampo en ratones carentes del receptor LPA<sub>1</sub>.

Para este estudio los animales fueron inyectados con **Clorhidrato de cocaína**, diluida en NaCl 0,9% (suero salino). A dosis de 20 mg/kg, siendo administrada vía intraperitoneal (i.p.).

## 3. ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO.

### 3.1. Manipulación de animales.

Previamente al inicio de los experimentos, todos los animales pasaron por un proceso de manipulación, durante una semana. El objeto de este proceso es la habituación de los animales al experimentador, de manera que se reduzcan los niveles de ansiedad y esto no influya como una variable contaminante en las mediciones experimentales (figura 2).

#### Proceso y secuencia de manipulación.

- 1) *Habitación al traslado*, desde el box hasta la sala de experimentación, en carrito, evitando ruidos y golpes a las cajas. Carrito de tres baldas. En cada una de ellas se colocan hasta un máximo de 6 jaulas, lo que ayuda a poder trasladarlas todas a la vez.
  - 2) *Acomodación a la sala experimental* (30-40 minutos, previos a la realización de cualquiera de los experimentos).
-

3) *Con cada jaula:*

3.1.- Marcaje con un código de colores en la cola (N-A-R-B) y manipulación:

3.1.1.- Día 1: leve, 1 minuto por animal.

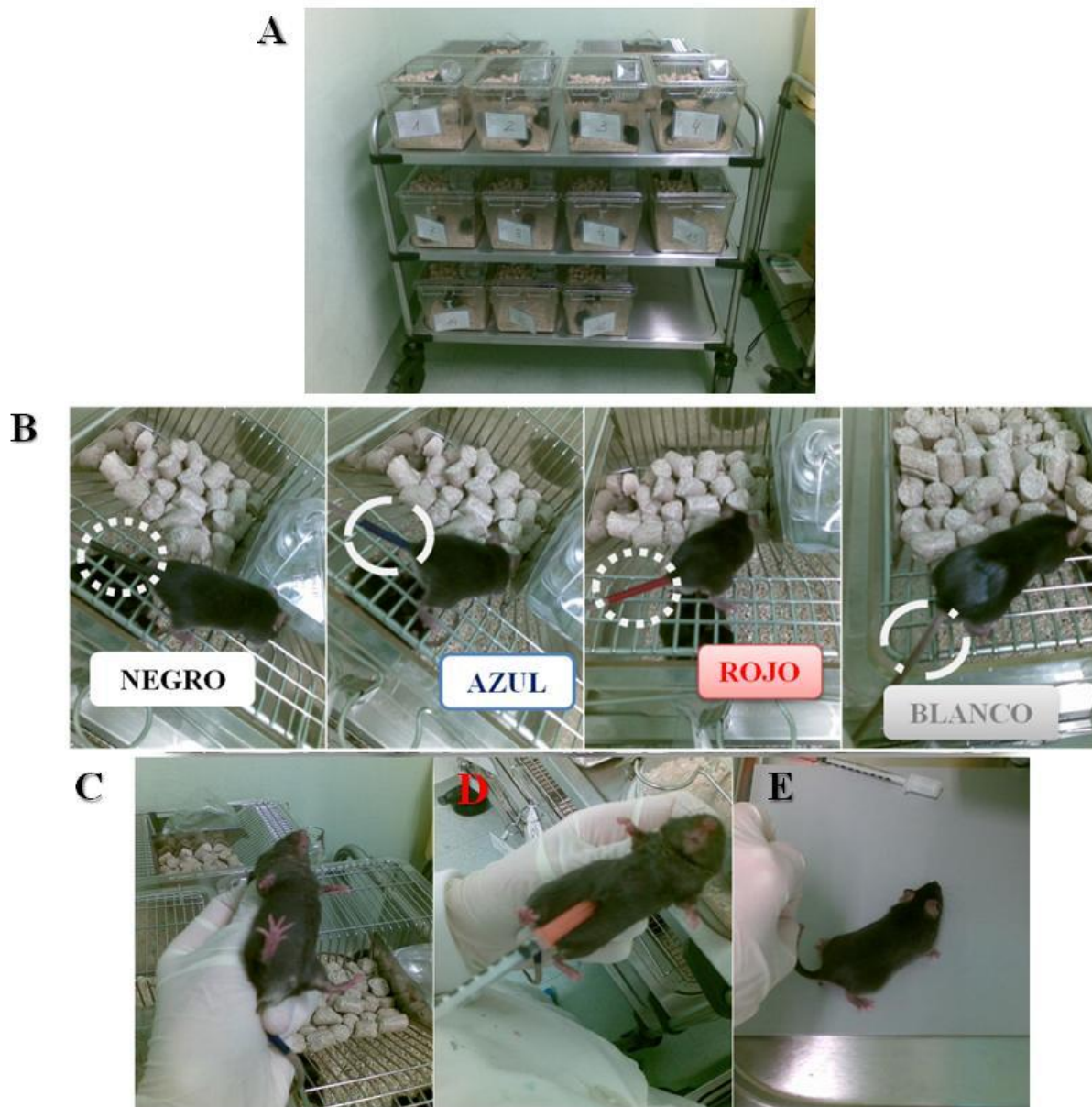
3.1.2.- Día 2-3: moderada, 3 minutos por animal.

3.1.3.- Días 4-5: intensa, 5 minutos por animal.

3.2.- Pesada de animales (último día).

3.3.- Agarre y simulación de la inyección.

3.4.- Habitación a la superficie del open field.



**Figura 2.** Imágenes del proceso de manipulación. A) Traslado de animales. B) Marcaje animal. C) Agarre del animal. D) Simulación del pinchazo. E) Acomodación a la textura de la base del open field.

### 3.2. Test de evaluación de locomoción: Campo abierto (open field).

Para llevar a cabo el registro conductual y dado que los ratones son de color oscuro, se utilizó un campo abierto de fondo gris de dimensiones 40x40 cm, con cuatro arenas (figura 3).



**Figura 3.** Imagen del open field usado para evaluar locomoción espontánea e inducida en ratón C57/Bl6J, tras la administración de diferentes compuestos farmacológicos.

Las condiciones de iluminación en las que se llevaron a cabo el desarrollo de los experimentos fueron determinadas a 20-25 luxes en el centro de cada arena, mediante un luxómetro PCE-174 (figura 4). Los animales se situaron individualmente en el centro de cada campo abierto después de la inyección de los tratamientos correspondientes.



**Figura 4.** Luxómetro PCE-174 de medición de condiciones de iluminación.

La conducta se registró mediante videoregistro durante 30, 60 y 120 minutos, dependiendo del experimento. Los resultados obtenidos se midieron como distancia recorrida en centímetros.

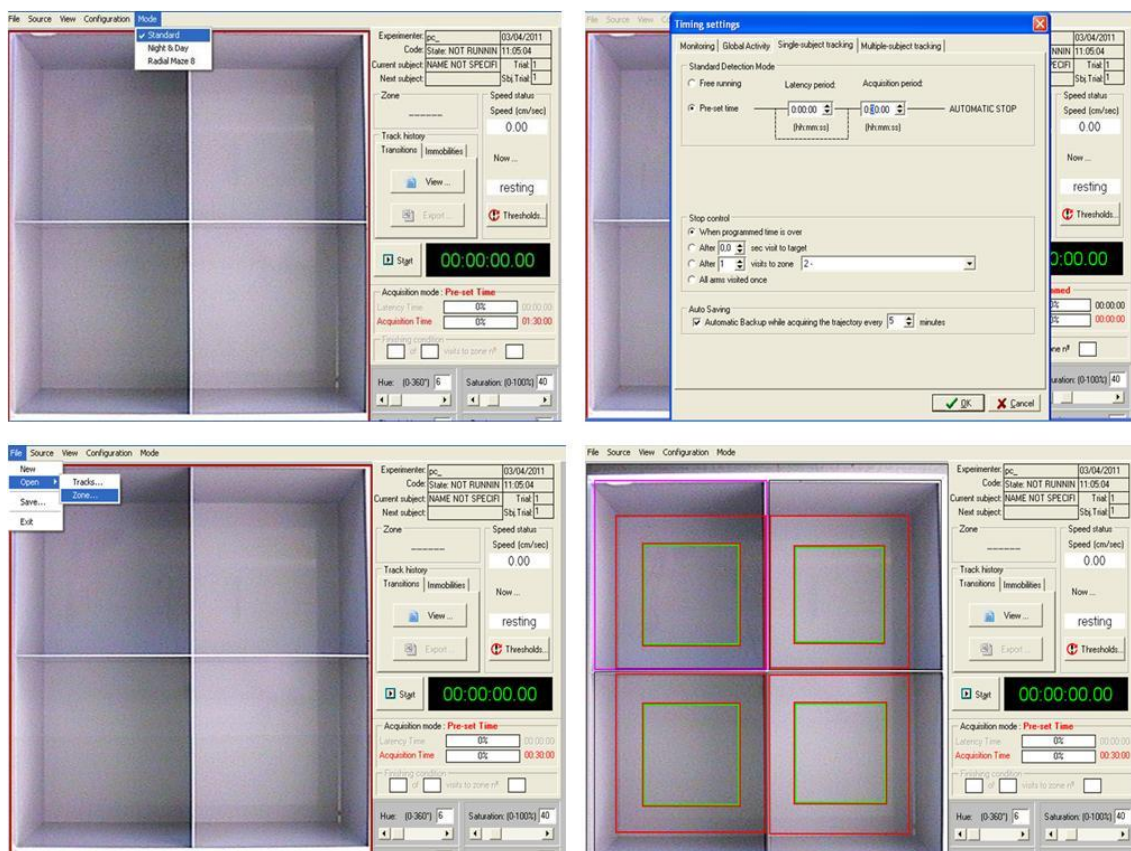
---



### 3.2.1. Programa de registro: Smart v2.5.

El programa Smart v2.5., permite el registro de la actividad, trayectorias, eventos o interacciones sociales y realiza cálculos en una amplia gama de parámetros de análisis.

La conducta se registra mediante videoregistro (Smart, versión 2.5, Panlab, Barcelona), en base a una serie de parámetros establecidos previamente al comienzo del experimento: modo, tiempo, zona, etc. (figura 5). En primer lugar, se establece el modo en el que se usará el programa, en nuestro caso, en modo *standard*. Tras esto, se determina el tiempo que debe durar el ensayo que quedó establecido para los experimentos en varios intervalos temporales: 30, 60 y 120 minutos, en función de la conducta a evaluar y el compuesto administrado. Posteriormente, se concreta una zona en la que una vez situado al animal, éste es detectado y se va registrando su conducta. En nuestro caso, se diseñó una plantilla de registro con una zona central por cada una de las arenas. Esta división nos proporcionó información adicional para evaluar el proceso de habituación de los animales en el laberinto mediante la reducción de la conducta de *thigmotaxis*.



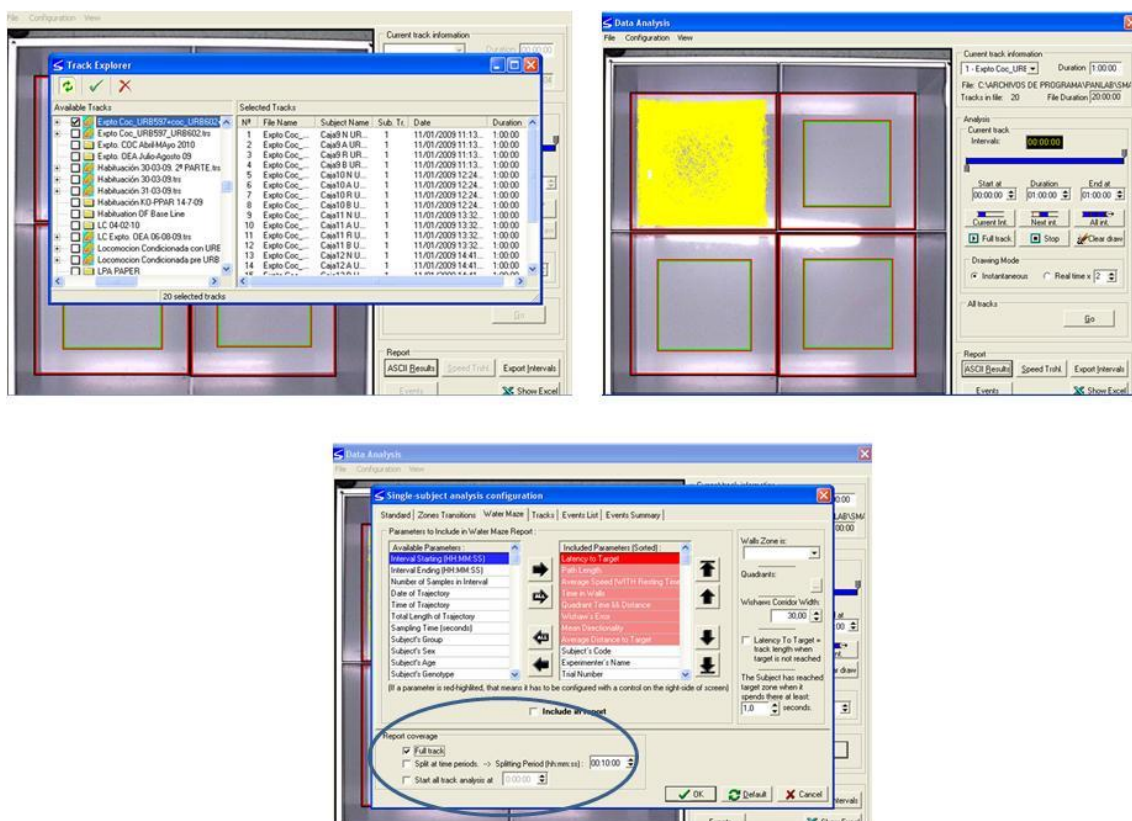
**Figura 5.** Parámetros del software Smart v2.5: modo de análisis, duración por ensayo y determinación de zona.

Finalmente, los resultados obtenidos se midieron como distancia recorrida en centímetros, sirviendo este parámetro como índice de actividad locomotora de los animales de experimentación.

La variable inmovilidad fue analizada empleando el filtro automático de movimiento incluido en el programa, estableciendo el rango de detección a menos de 10 cm/sg.

La trayectoria de los animales se registra por imágenes de video en tiempo real, almacenándose esos registros de forma que se permita su análisis y poder volver a *posteriori* a los ensayos realizados en los experimentos, con diferentes configuraciones de zonas y parámetros de registro adicional.

Los parámetros evaluados se presentan en informes completamente configurables por el usuario (figura 6). El informe obtenido tras finalizar el experimento puede ser por tiempo completo de cada animal (*full track*) o puede ser dividido en diferentes intervalos de tiempo, en estos experimentos empleamos intervalos de 10 minutos. Los resultados pueden ser directa y automáticamente exportados a una hoja Excel.



**Figura 6.** Smart v2.5. Trayectoria de animales, exploración y determinación de datos.

### 3.3. Test de evaluación de estereotipias: *Test medición en cilindro* (TMC).

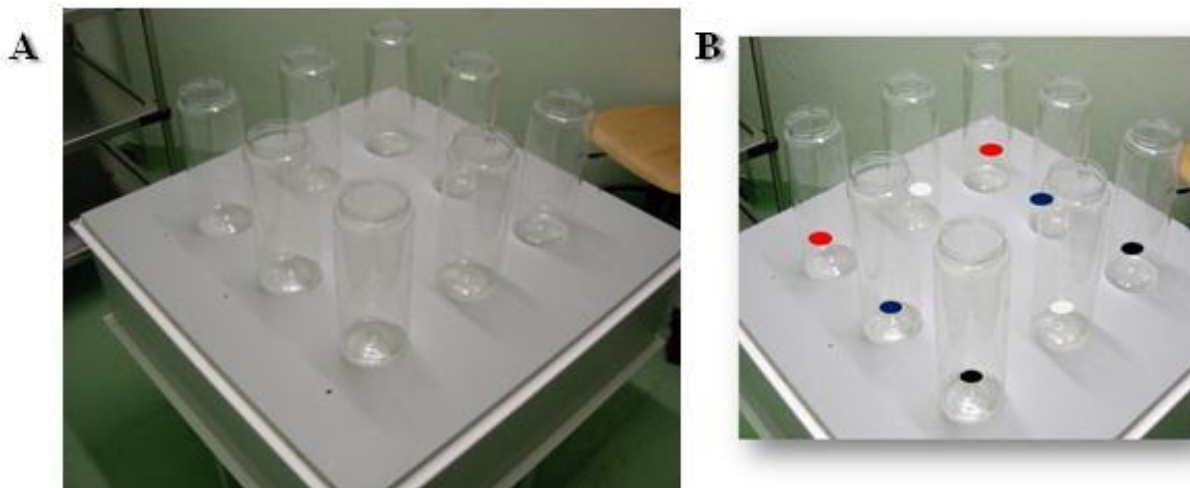
En la medición de las conductas estereotipadas se modificó el test del campo abierto con el propósito de observar, de forma precisa, las estereotipias realizadas por los animales. En este sentido, se necesitaba un material transparente de cierta altura, que permitiera un acceso fácil para la evaluación de la conducta desde el plano vertical. Se pensó usar cilindros de plástico, transparentes, pegados de forma estratégica a la base del campo abierto, de tal forma que el investigador pudiera ver, simultáneamente, a cuatro animales al mismo tiempo (figura 7).

La forma de medición de las conductas estereotipadas se hizo por conteo manual por dos investigadores a doble ciego. Así, se decidió establecer intervalos de 10 minutos a lo largo de los 120 minutos evaluados, y en cada intervalo se midió la frecuencia de cada estereotipia realizada por cada animal. Como señala Ferrer, *et al.*, (2007), las estereotipias se consideran actos repetitivos de comportamiento, contados a partir del acto inicial (sin considerar este primero), esto se entendería como un marcador de la desorganización del comportamiento mediada por la dopamina.

Cada tubo se marcó para cada una de las dosis a administrar:

- **Negro:** 1mg/kg. **Azul:** 0,1mg/kg. **Rojo:** 0,05mg/kg. Sin marca: NaCl 0,9% (vehículo).

Cada animal se situó en el tubo correspondiente a la dosis recibida.



**Figura 7.** A) Imagen del test de *medición en cilindros* usado para evaluar estereotipias (*jumping*, auto-aseo, alzada y escalada) en animales C57/Bl6J tras la administración del agonista D2, quinpirole. B) Cada tubo tenía una marca representativa de cada dosis del compuesto farmacológico.

Con este test medimos la conducta de salto y conductas estereotipadas (figura 8). Fundamentalmente, las esterotipias evaluadas fueron (figura 9): salto (*jumping*), escalada (*climbing*), auto-aseo (*grooming*) y alzada (*rearing*).



**Figura 8.** Test de *medición en cilindros*, análisis estereotipias. Animales situados en su cilindro correspondiente a dosis de quinpirole (0,1 y 1 mg/kg).



**SALTO**



**ESCALADA**



**ASEO**



**ALZADA**

**Figura 9.** Ejemplos de conductas estereotipadas evaluadas (salto, escalada, auto-aseo y alzada) a través del test de *medición en cilindros*.

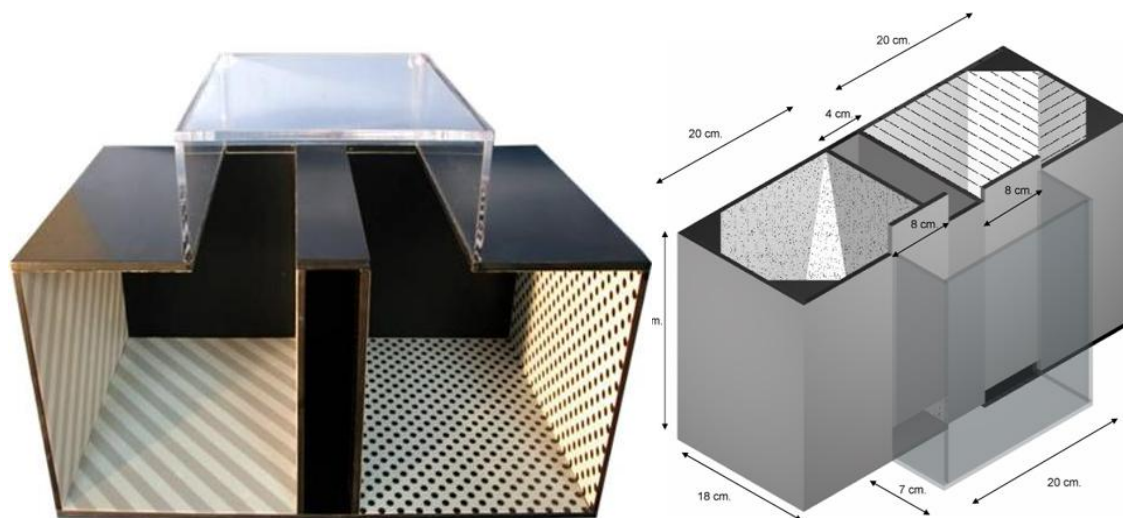


### 3.4. Test de evaluación de lugar preferencial.

La prueba de condicionamiento de lugar preferencial (conocido comúnmente por sus siglas en inglés CPP o en español, CLP), evalúa si el animal pasa mayor cantidad de tiempo en el compartimento asociado con los efectos de la droga o en el medio vinculado a la solución vehículo. La preferencia demuestra que el ambiente asociado a los efectos de drogas ha adquirido propiedades de incentivos (Arnold, 2005; Tanda, 2007; Fattore, *et al.*, 2007).

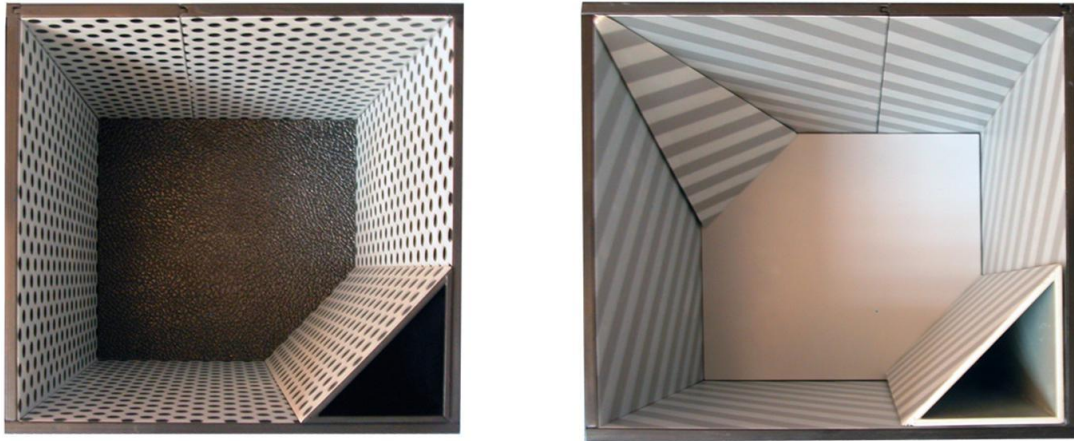
El procedimiento conductual para llevar a cabo este tipo de experimentos consistió en tres fases: Fase de pre-condicionamiento (1 sesión), condicionamiento (8 sesiones) y prueba de preferencia de lugar (1 sesión).

Se usaron dos cajas de lugar preferencial (Panlab, Barcelona, España). Esta prueba consta con una cámara de plexiglás experimental, con dos compartimentos de igual tamaño (20 x 18 x 25 cm) interconectados a un pasillo rectangular (20 x 25 x 7) a través de puertas de guillotina (figuras 10 y 11).



**Figura 10.** Imagen de cajas de condicionamiento de lugar preferencial. **Figura 11** Dimensiones de la caja de lugar preferencial.

Los dos compartimentos se diferencian por señales sensoriales diferentes. Un compartimiento tenía paredes punteadas, el suelo áspero y de color gris-negro. El compartimento opuesto era de paredes rayadas, piso liso y de color blanco y gris (figura 12).



**Figura 12.** Compartimentos del test de cajas de condicionamiento de lugar preferencial.

La intensidad máxima de la luz dentro de los compartimentos fue de 25 lux. También se usaron paredes transparentes para minimizar el tiempo que el animal pasó en el corredor que conectaba ambos compartimentos.

Todas las sesiones fueron monitoreadas por un sistema de videoregistro (Smart<sup>®</sup> Panlab, Barcelona, España) con las imágenes transmitidas desde una cámara colocada sobre el aparato a un ordenador mediante el programa Smart v.2.5 (Panlab), descrito con anterioridad.

#### **4. DISEÑO EXPERIMENTAL.**

##### **4.1. Protocolo de curva dosis-respuesta en cocaína.**

Para determinar las dosis adecuadas y observar el perfil farmacológico de la respuesta a distintas dosis de cocaína en los distintos modelos animales estudiados, se siguieron los siguientes protocolos:

Sobre los animales usados, ratones C57/Bl6J, se administró cocaína i.p. a diferentes dosis: 0, 5, 10 y 20 mg/kg. Seguido a la inyección de la droga, se ensayó el test del campo abierto durante treinta minutos.

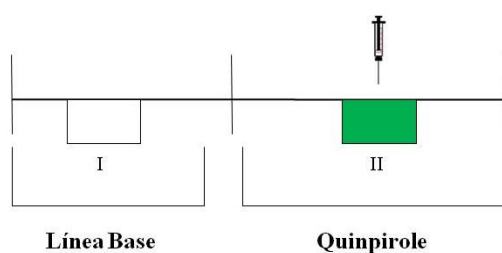
##### **4.2. Estudio de locomoción, estereotipias y salto tras la administración de un agonista D2/D3 (quinpirole).**

Para la evaluación de las conductas de locomoción, estereotipias y conducta de salto, evaluamos a diferentes grupos de animales en campo abierto y test en tubos a 60 y 120 minutos con diferentes dosis de quinpirole 0.05, 0.5 y 1 mg/kg.

#### 4.2.1. Locomoción, estereotipias y salto inducido por la administración de quinpirole.

Antes de la administración del compuesto, los animales pasaron por el test campo abierto, sin dosis del compuesto, para la obtención de una línea base de actividad locomotora. Con posterioridad, los animales recibían el compuesto farmacológico agonista de receptores D2, quinpirole (0.25, 0.05, 0.1 y 1 mg/kg s.c.), y seguidamente se midió la locomoción en campo abierto.

Igualmente, se midieron los niveles de inmovilidad generados por la administración de quinpirole (0,05, 0,1 y 1 mg/kg) de forma s.c. (figura 13).



**Figura 13.** Esquema del proceso en la administración con quinpirole.

En el caso de las conductas de estereotipias y salto, se administró el quinpirole de forma s.c., a dosis de 0.05, 0.1 y 1 mg/kg en el test de *medición en cilindros*. Se inyectaron las dosis correspondientes a cada animal y se pasó la prueba midiendo la frecuencia, en una hoja de registro estandarizada, de cada una de las estereotipias.

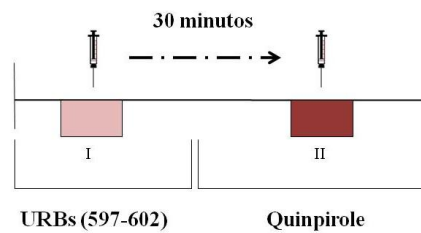
#### 4.2.2. Efecto de la administración de inhibidores de la degradación enzimática de FAAH y MAGL sobre estereotipias y salto.

Se estudiaron diferentes estereotipias y conducta de salto administrando el agonista D2 solo y en co-administración con los inhibidores enzimáticos ya mencionados.

Cuando se administró solo el quinpirole, se inyectó el compuesto con tres diferentes dosis y se colocó al animal en cada uno de los tubos correspondientes a la dosis.

Sin embargo, cuando se co-administró tanto con el URB597 como con el URB602, se inyectaron estos inhibidores enzimáticos 30 minutos antes de la administración del agonista D2. Tras pasar los 30 minutos de la inyección del

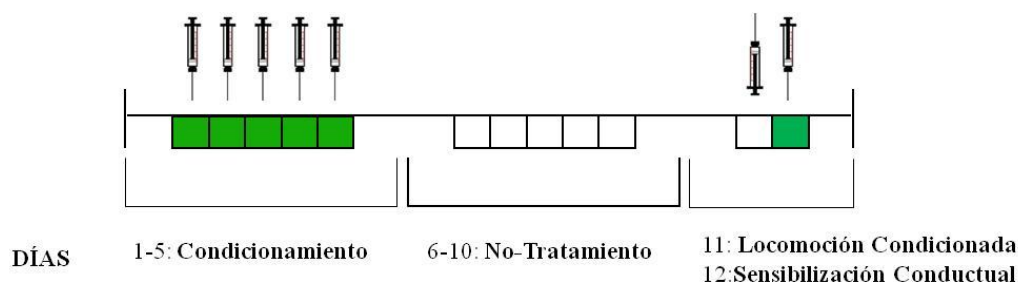
quinpirole, se administraron los inhibidores de la degradación y se situaron los animales en cada uno de los tubos asignados según su dosis (figura 14).



**Figura 14.** Esquema del proceso en la administración con quinpirole e inhibidores de enzimas de degradación.

#### 4.3. Protocolo de sensibilización conductual a cocaína.

Los animales son sometidos a un programa de un total de 12 días, entre los que se subdividen diferentes fases en la sensibilización a cocaína (figura 15).



**Figura 15.** Esquema de las fases en el proceso de sensibilización a cocaína.

##### 4.3.1. SC modulada por agonistas no cannabinoides.

Una primera fase, consistió en cinco días consecutivos de administración de los compuestos (aciletanolamidas y psicoestimulantes) vía intraperitoneal.

En el *estudio 1* (reversión de la hiperactividad inducida por los receptores de dopamina D2 mediada por los inhibidores de la degradación de endocannabinoides), existieron una serie de grupos:

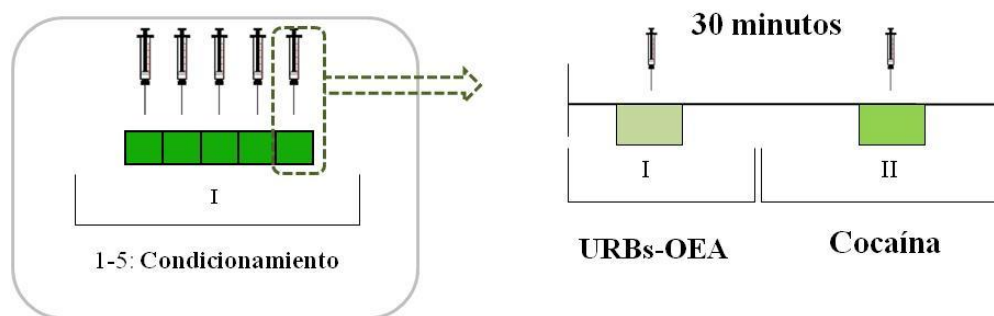
- Grupo tratado con vehículo (NaCl 0,9%).
- Grupo tratado con cocaína (20 mg/kg).
- Grupo en el que se co-administró cocaína más una dosis de los inhibidores de enzimas de degradación de FAAH (URB597) y MAGL (URB602).

En el *estudio 2* (papel de oleiletanolamida y su receptor PPAR $\alpha$  en la sensibilización conductual inducida por cocaína y preferencia de lugar condicionada), se tuvieron varios grupos:

- Grupo tratado con vehículo (NaCl 0,9%).
- Grupo tratado con cocaína (20 mg/kg).
- Grupo en el que se co-administró cocaína más una dosis de la aciletanolamida estudiada: OEA.

El procedimiento de administración consistió en lo siguiente:

Cada uno de los cinco días de condicionamiento, los animales fueron inyectados con los compuestos cannabinomiméticos y aciletanolamidas 30 minutos antes de la inyección de cocaína (20 mg/kg). Transcurrido ese intervalo de tiempo y tras la administración inicial de los compuestos cannabinomiméticos y aciletanolamidas, se inyectaba la cocaína y se pasaba la prueba de campo abierto durante otros 30 minutos (figura 16).



**Figura 16.** Esquema representativo del proceso de administración durante cinco días de los compuestos cannabinoides (URBs, OEA) y psicoestimulantes (cocaína).

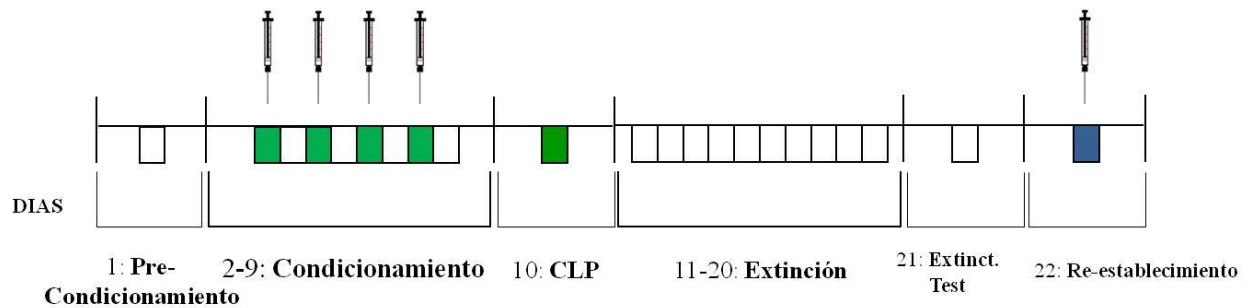
Después del programa de administración de cocaína de cinco días, se dejaron descansar a los distintos grupos experimentales otros cinco días sin recibir ningún tipo de droga ni pasar por el campo abierto.

Seis días después de la última administración, es decir, el día 12 desde el comienzo del programa se ensayó con todos los grupos experimentales el campo abierto, pero esta vez todos los animales recibieron una dosis de vehículo. Con este procedimiento medimos la locomoción condicionada inducida tras el condicionamiento previo.

Al día siguiente se midió la reinstauración de los efectos sensibilizadores de la cocaína, en este caso a una dosis de 10 mg/kg. Con esto, conseguimos evaluar la sensibilización conductual.

#### 4.4. Análisis del papel de la OEA y su receptor PPAR $\alpha$ , en Sensibilización Conductual inducida por cocaína y Condicionamiento de Lugar Preferencial.

Los animales son sometidos a un programa de un total de 22 días entre los que se subdividen diferentes fases en el Condicionamiento de Lugar Preferencial (figura 17).



**Figura 17.** Esquema de las fases en el proceso de condicionamiento de lugar preferencial.

##### 4.4.1. Efectos de la OEA-cocaína en la respuesta locomotora aguda.

Se midieron los efectos de la interacción de OEA y cocaína aguda en la actividad locomotora. Los ratones se dividieron en ocho grupos:

- Tres grupos con OEA (1, 5 y 20 mg/kg).
- Un grupo control OEA (vehículo).
- Tres grupos con OEA (1, 5 y 20 mg/kg)+cocaína (20 mg/kg).
- Grupo control con cocaína (vehículo + cocaína, 20 mg/kg).

Se empleó el test de campo abierto descrito con detalle en los anteriores experimentos.

Se administraron los tratamientos y los animales fueron expuestos a las cajas de CLP durante 20 minutos. La distancia total (cm) recorrida se midió utilizando el sistema de videoregistro (Smart<sup>®</sup> Panlab, Barcelona, España) y el porcentaje de aumento o disminución de la actividad locomotora respecto a la solución salina.

##### 4.4.2. Efectos de la administración de OEA en SC inducida por cocaína.

En la sesión de preconditionamiento (día 0), todos los ratones se colocan en el centro del corredor neutro y se dejan explorar libremente los dos compartimientos, midiéndose el tiempo empleado en cada lugar durante 20 minutos. Durante la fase de condicionamiento, se inyectó a los ratones i.p una vez al día con vehículo (solución

salina), cocaína (20 mg/kg), cocaína + OEA (cocaína 20 mg/kg + OEA 5 mg/kg) durante 4 días consecutivos (días 1-4) seguido por 5 días sin tratamiento (días 5-9).

Después del período libre de drogas y 6 días después de la sesión de condicionamiento, todos los animales fueron inyectados con el vehículo para llevar a cabo la prueba de locomoción condicionada (LC) (10 días, período post-condicionamiento). Tras 24 horas, los animales recibieron una inyección de vehículo (solución salina), cocaína (10 mg/kg) o cocaína + OEA (10 mg/kg de cocaína + OEA 5 mg/kg) para evaluar la sensibilización conductual (SC) (día 11). Cada sesión se inició mediante la colocación de los animales en el centro del campo abierto (descrito anteriormente) y con una duración de 20 minutos.

#### 4.4.3. *Efecto de OEA en CLP inducida por cocaína.*

Durante el período de pre-condicionamiento (día 1), todos los ratones fueron colocados en el centro del corredor neutro, permitiendo la exploración libre de ambos compartimentos, midiéndose el tiempo empleado en cada compartimento, durante 20 minutos.

El Condicionamiento de Lugar Preferencial (del día 2 al 9) se llevó a cabo mediante un procedimiento imparcial. La mitad de los animales recibieron OEA (1, 5 y 20 mg/kg), cocaína (20 mg/kg), OEA (1, 5 y 20 mg/kg) + cocaína (20 mg/kg) y el vehículo (solución salina) en el compartimento de forma espontánea preferida y la otra mitad en el compartimento no elegido. Inmediatamente después de la inyección, cada ratón se asignó a los compartimentos de drogas durante 20 minutos. Las cajas fueron bloqueadas por una puerta de guillotina y no se conectaron nunca, durante el condicionamiento.

Los animales recibieron inyecciones de la droga en los días 2, 4, 6 y 8, e inyecciones de vehículo en los días 3, 5, 7 y 9. Durante la prueba de preferencia (día 10), cada ratón se colocó de nuevo en el corredor, sin inyección de drogas, y se les permitió explorar libremente el aparato durante 20 minutos.

La puntuación de CLP representa la diferencia entre el tiempo pasado (segundos) en el compartimento pareado de las drogas menos el tiempo pasado en el compartimento pareado de solución salina durante la prueba de preferencia (duración total, 20 minutos).

---



#### 4.4.4. SC inducida por cocaína en animales KO-PPAR $\alpha$ .

Del primer al segundo día antes del condicionamiento, todos los animales fueron sometidos a sesiones de habituación durante 30 minutos. Esta valoración inicial se realizó para comparar la exploración del comportamiento de ratones WT y KO-PPAR $\alpha$  en respuesta a un campo abierto nuevo o familiar.

El procedimiento que se hizo fue similar al del experimento 2. Las principales diferencias fueron las siguientes:

- Tipo de ratones utilizados en este experimento: KO-PPAR $\alpha$  y WT.
- En la fase de condicionamiento, los animales fueron inyectados diariamente con el vehículo (solución salina) o la cocaína (20 mg/kg) (días 1 -5).
- En la prueba de SC, los ratones recibieron una dosis única de vehículo (solución salina) o cocaína (de 10 mg/kg) para evaluar SC (día 12).

#### 4.4.5. CLP inducido por cocaína en animales KO PPAR $\alpha$ .

Todo el procedimiento consistió en seis fases: Fase de pre-condicionamiento (1 sesión), condicionamiento (8 sesiones), prueba de preferencia (1 sesión), extinción (10 sesiones), prueba de la extinción (1 sesión) y prueba de re-establecimiento (1 sesión).

Las fases de pre-condicionamiento, condicionamiento y prueba de preferencia se ejecutaron tal y como se describe más arriba (*Efecto de OEA en CLP inducida por cocaína*), extinción, prueba de extinción y restablecimiento se realizaron como se describe a continuación (*Extinción-restablecimiento de priming de cocaína en ratones KO-PPAR $\alpha$* ).

#### 4.4.6. Extinción-restablecimiento en ratones KO-PPAR $\alpha$ .

Tras el condicionamiento y la prueba de preferencia, los ratones fueron sometidos a sesiones de 20 minutos diarios de extinción (días 11-20). Todos los animales fueron inyectados con solución salina durante este período de abstinencia a cocaína. El día después de la extinción, los ratones fueron sometidos al test de extinción (día 21) en la misma forma a la prueba de preferencia descrita anteriormente. Al día siguiente, se eligió una inyección de priming de cocaína (10 mg/kg) para restaurar la preferencia en el CLP. Se evaluó el restablecimiento de la prueba (día 22) por cocaína, usando una dosis baja de cocaína en una prueba idéntica a la prueba de preferencia (descrita anteriormente).

---



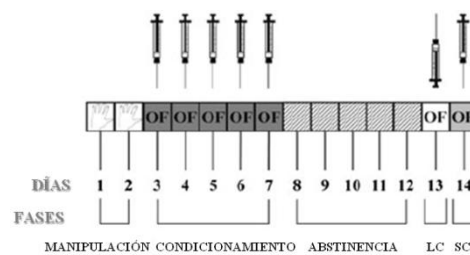
#### 4.4.7. Efectos de la OEA en SC inducida por cocaína en ratones KO-PPAR $\alpha$ .

En el último experimento, se repitió el mismo procedimiento de la prueba de comportamiento realizado en el experimento 4 pero en esta ocasión, con una sola dosis de OEA (20 mg/kg).

#### 4.5. Protocolo de sensibilización conductual a cocaína con animales LPA $_1$ .

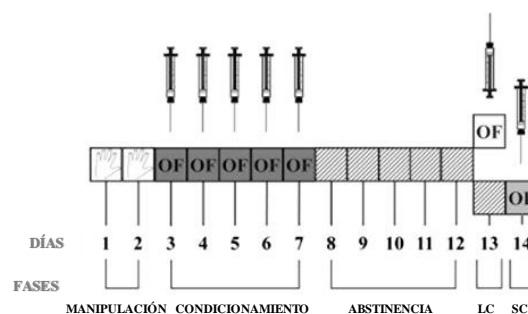
Ver apartado 4.3. *Protocolo de sensibilización conductual a cocaína.*

No obstante, en este caso y con este tipo de animales, en el día 11 de la prueba se evaluó la locomoción condicionada (LC) administrando vehículo y en el día 12 se registró la sensibilización conductual (SC), probando el efecto de una dosis de cocaína de 10 mg/kg, midiéndose en el contexto emparejado a la administración de cocaína. LC y SC fueron evaluadas utilizando tres horarios diferentes. En el primero de ellos, se evaluó una serie de animales en LC y SC como se escribe en el apartado anterior (4.3) (figura 18).



**Figura 18.** Esquema para el tratamiento de la sensibilización a cocaína y pruebas de serie para la locomoción condicionada y la sensibilización conductual.

En el segundo horario, se usaron un conjunto diferente de animales para la LC y SC (figura 19).



**Figura 19.** Efectos de la cocaína en la locomoción y sensibilización condicionada medida en diferentes grupos de cualquiera de los grupos: WT o KO-maLPA $_1$ . Un esquema para el tratamiento de la sensibilización a cocaína y pruebas para la locomoción condicionada y sensibilización conductual.

Por último, En el tercer horario, se evaluó sólo la SC en animales inyectados con solución salina y habituados al campo abierto hasta un patrón estable de locomoción

que se estableció en 60 minutos después de la inyección. Para ambos genotipos (WT y KO-maLPA<sub>1</sub>), se tuvieron tres grupos experimentales:

- Animales condicionados con cocaína (20 mg/kg) y administrado con cocaína (10 mg/kg de cocaína-sensibilización).
- Animales condicionados con vehículo y tratados con vehículo (control del vehículo).
- Animales condicionados con cocaína (10 mg/kg).

### **Análisis de datos**

Se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos en los distintos estudios, usándose la media, el Error Estándar de la Media (E.E.M), así como un contraste de hipótesis de normalidad. Los resultados fueron analizados con distintos tests paramétricos en función de la composición de las variables. Así, para la comparación entre dos únicos grupos experimentales, se hizo mediante el test de *Student*, mientras que en el caso de comparación de múltiples grupos se realizó mediante análisis de varianza ANOVA, realizando análisis post hoc con el estadístico de contraste *Bonferroni* en el caso de encontrar diferencias significativas. En todos los casos se adoptó un nivel de confianza del 95% como criterio de significación estadística (probabilidad de error menor de 0.05).

Para el análisis de datos, se usó el programa estadístico informático *SSPS 15.0 para Windows* (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

---



## RESULTADOS

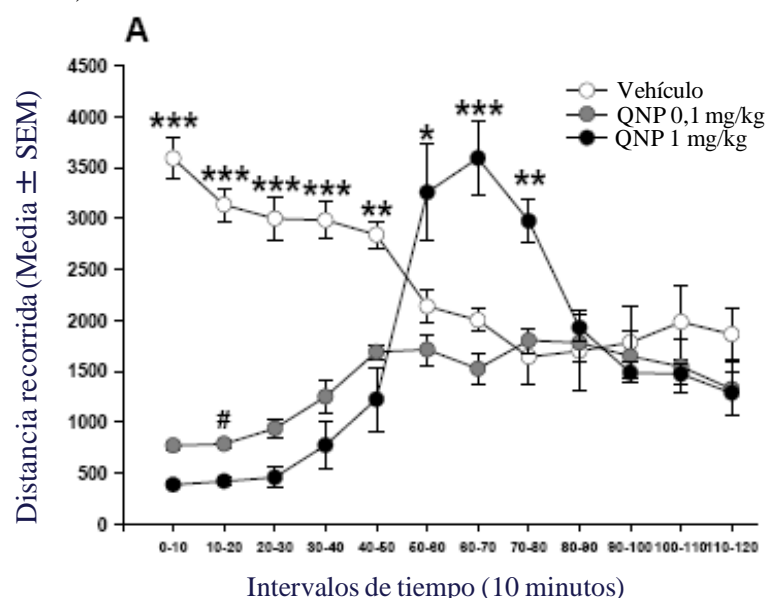
---



## ESTUDIO 1. Reversión de la hiperactividad inducida por la activación de los receptores D2/D3 mediante la inhibición de la degradación de endocannabinoides.

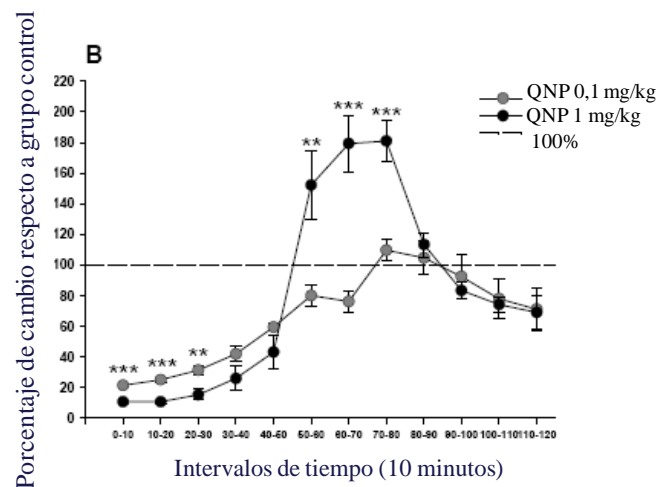
### 1. Hiperactividad e inmovilidad inducida por el tratamiento agudo con quinpirole en ratones C57/BI6J.

Los ratones fueron inyectados con dos dosis de QNP (0,1 mg/kg ó 1 mg/kg) y vehículo e inmediatamente expuestos a campo abierto durante 2 horas. Se midió la distancia recorrida en intervalos de tiempo de 10 min. ANOVA de 2 vías mostró que los principales efectos del tratamiento, el intervalo de tiempo y la interacción tiempo del intervalo x tratamiento fueron significativos ( $F_{(2, 27)} = 21.87, p < 0,000$ ;  $F_{(5, 28, 142, 66)} = 8,40, p < 0,000$ ;  $F_{(10, 56, 142, 66)} = 19.22; p < 0,000$ , respectivamente). Tras realizar ANOVA de una vía en cada intervalo de tiempo de 10 minutos, mostró que el efecto principal del tratamiento fue significativo en los ocho primeros intervalos de tiempo ( $F_{(2, 27)} = 203.94, p < 0,000$ ,  $F_{(2, 27)} = 223,61, p < 0,000$ ,  $F_{(2, 27)} = 86.32, p < 0,000$ ,  $F_{(2, 27)} = 35.93, p < 0,000$ ,  $F_{(2, 27)} = 17.09, p < 0,000$ ,  $F_{(2, 27)} = 6,96, p < 0,000$ ,  $F_{(2, 27)} = 20.31, p < 0,000$ ,  $F_{(2, 27)} = 11.69, p < 0,000$ , respectivamente). Comparaciones múltiples *post-hoc* revelaron que los ratones inyectados con ambas dosis de QNP muestran una distancia recorrida significativamente menor que los animales administrados con vehículo durante los primeros 50 minutos del primer ensayo (figura. 1A). En contraste, desde el minuto 50 a 80, los ratones inyectados con 1 mg/kg de QNP mostraron una distancia recorrida significativamente más larga que los ratones inyectados con 0,1 mg/kg de QNP o con vehículo (figura 1A).



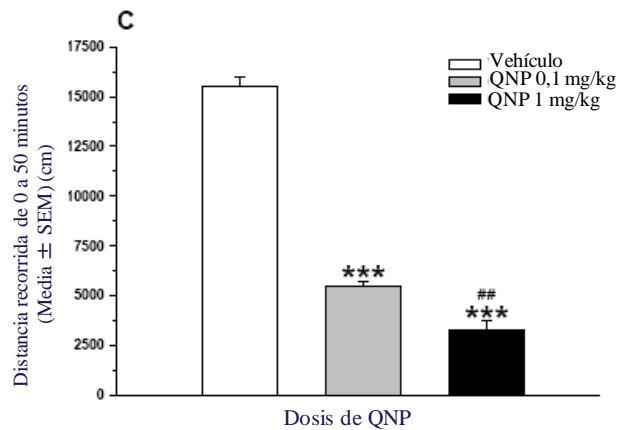
**Figura 1.** Efectos del tratamiento agudo con el agonista de los receptores D2, quinpirole (QNP) sobre la actividad locomotora en ratones C57/BI6J. (A) Actividad locomotora (\*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*  $p < 0,005$  vs. el resto de los grupos #  $p < 0,05$  vs. QNP 1 mg/kg).

Cuando se expresó la locomoción en porcentajes de distancia recorrida por los ratones inyectados con vehículo, ANOVA de dos vías mostró que los principales efectos del tratamiento, el intervalo de tiempo y la interacción del tratamiento x el tiempo de intervalo fueron significativos ( $F_{(1, 18)} = 5,43$ ,  $p = 0,032$ ,  $F_{(4,37, 78,71)} = 46,56$ ,  $p < 0,000$ ,  $F_{(4,37, 78,71)} = 10,34$ ,  $p < 0,000$ , respectivamente). Pruebas *post-hoc* revelaron que durante los primeros 30 minutos, los ratones inyectados con 1mg/kg de QNP muestra un porcentaje significativamente menor de la distancia que los ratones inyectados con 0.1mg/kg de QNP, mostrando ambos grupos los niveles más bajos de locomoción en comparación con los ratones inyectados con vehículo (figura 1B).

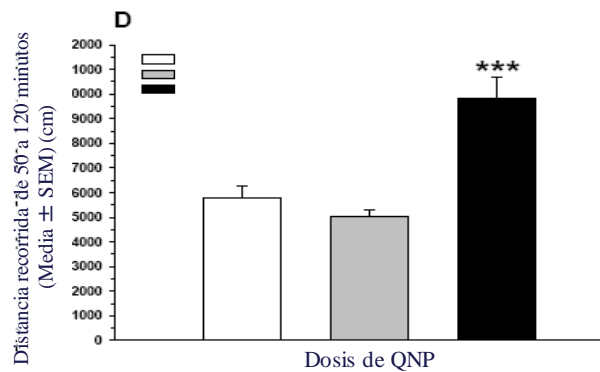


**Figura 1(B):** Porcentaje de cambio en la locomoción (\*\* $p < 0,001$  y \* $p < 0,01$ ) respecto al grupo control con vehículo, después de la administración aguda QNP.

Por el contrario, del minuto 50 a 80, los ratones inyectados con 1mg/kg de QNP mostraron un porcentaje significativamente mayor de la distancia que los ratones inyectados con 0.1mg/kg de QNP o vehículo (figura 1B). Además, con los datos agrupados, de 0 a 50 minutos y de 50 a 120 minutos, ANOVAs de una vía reveló ser significativo ( $F_{(2, 27)} = 270,28$ ,  $p < 0,000$ ,  $F_{(2, 27)} = 19,37$ ,  $p < 0,000$ , respectivamente). De 0 a 50 minutos, se muestra como existe una disminución de la locomoción de los grupos administrados con quinpirole vs. el grupo control. Por otro lado, de 50 a 120 minutos, el grupo inyectado con la dosis más alta de QNP muestra una distancia recorrida significativamente más larga en comparación con los animales inyectados con 0,1 mg/kg de QNP o vehículo (figura 1D).



(C) Efecto de la hipolocomoción inducida por quinpirole en los primeros 50 minutos (\*\* $p < 0,001$  vs. grupo de control (vehículo);  $^{##}p < 0,01$  vs. grupo QNP 0,1 mg/kg) y hiperlocomoción.

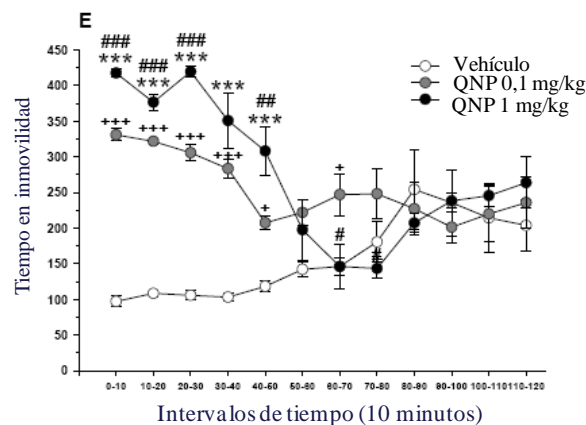


(D) Durante los últimos 70 minutos (\*\* $p < 0,001$  vs. grupo QNP 0,1 mg/kg y grupo control (vehículo)).

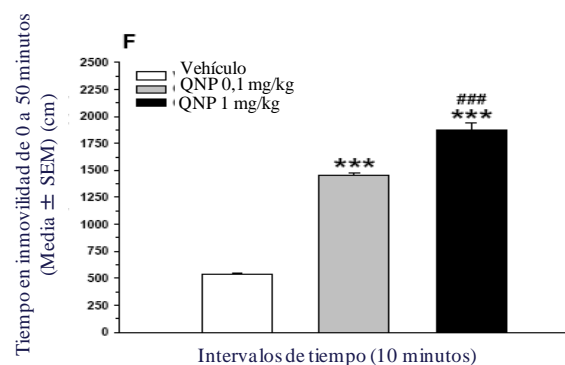
También se midió el tiempo de inmovilidad. ANOVA de dos análisis mostró que los principales efectos del tratamiento, el intervalo de tiempo y la interacción del tratamiento x el tiempo de intervalo fueron significativos ( $F_{(2, 27)} = 16.54$ ,  $p < 0,000$ ,  $F_{(3,51, 94,80)} = 6,79$ ,  $p < 0,000$ ,  $F_{(7,02, 94,80)} = 10,78$ ,  $p < 0,000$ , respectivamente). Al realizar ANOVA de una vía en cada intervalo de tiempo, mostraron que el efecto principal del tratamiento fue significativa en los primeros 50 minutos y de 60 a 80 minutos (0-10min:  $F_{(2, 27)} = 461,37$ ,  $p < 0,000$ ; 10-20 min:  $F_{(2, 27)} = 377,08$ ,  $p < 0,000$ ; 20-30 min:  $F_{(2, 27)} = 311,39$ ,  $p < 0,000$ ; 30-40 min:  $F_{(2, 27)} = 28,94$ ,  $p < 0,000$ ; 40-50 min:  $F_{(2, 27)} = 21,62$ ,  $p < 0,000$ ; 60-70min:  $F_{(2, 27)} = 5,27$ ,  $p = 0,012$ ; 70-80min:  $F_{(2, 27)} = 3,79$ ,  $p = 0,036$ ). Comparaciones *post-hoc* indicaron que, durante los primeros 50 minutos, los ratones inyectados con ambas dosis de QNP se mantuvieron más tiempo inmóvil en comparación con los ratones tratados con vehículo, en una forma dosis-dependiente (figura 1E). De 60 a 80 minutos los ratones inyectados con la dosis más alta de QNP



pasaron tiempo similar inmóviles en comparación con los ratones inyectados con vehículo (figura 1E). Realizando ANOVA de una vía sobre los datos de 0 a 50 minutos fue significativa ( $F_{(2, 27)} = 226.48$ ,  $p < 0.000$ ) y las pruebas *post-hoc* confirmó que ambas dosis de QNP aumenta la locomoción, mostrando que la dosis de 1mg/kg ejercía un efecto más potente (figura 1F).



(E) Respuesta de inmovilidad después de la administración aguda de QNP (\*\* $p < 0.001$ , + + +  $p < 0.001$  y +  $p < 0.05$  vs. grupo control (vehículo); ###  $p < 0.001$ , ##  $p < 0.01$  y #  $p < 0.05$  vs. QNP 0,1 mg/kg),



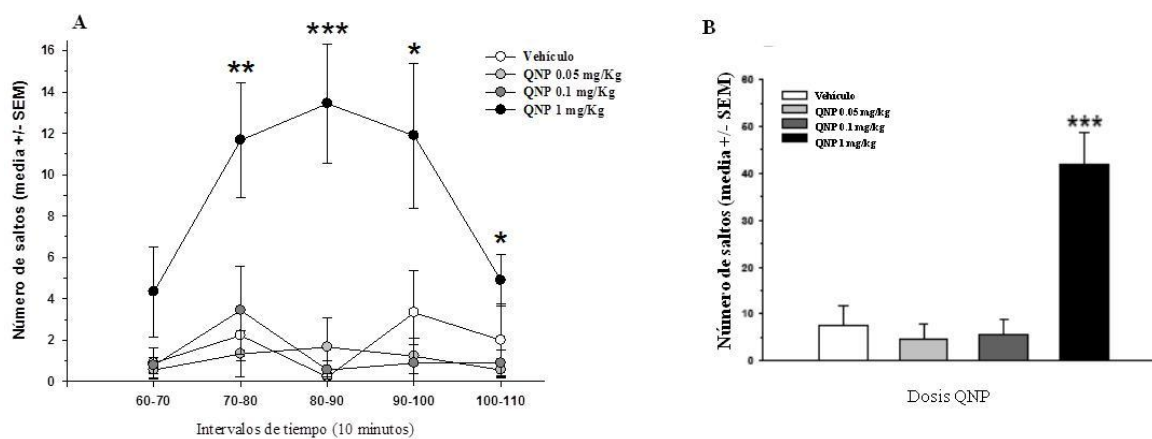
(F) Efecto de la inmovilidad inducida por quinpirole en los primeros 60 minutos (\*\* $p < 0.001$  vs. grupo control (vehículo); ###  $p < 0.001$  vs. QNP 0,1 mg/kg). Los valores representan la media  $\pm$  SEM.

## 2. Estereotipias provocadas por el tratamiento agudo con quinpirole en ratones C57/BI6J.

Se midió el número de conductas de salto durante dos horas después de la administración de vehículo o quinpirole en el test de *medición en cilindros*. El análisis de varianza de dos vías realizado en el intervalo entre 60 y 110 minutos indicó que los principales efectos del tratamiento, el intervalo de tiempo y el tiempo de interacción tratamiento x intervalo fueron significativos ( $F_{(3, 36)} = 15.04$ ,  $p < 0.000$ ;  $F_{(3,07, 110.53)} = 5.31$ ,  $p = 0.001$ ;  $F_{(9,21, 110.53)} = 3.25$ ,  $p < 0.000$ ; respectivamente). ANOVA de una vía realizadas en cada intervalo de tiempo mostraron que el principal efecto del tratamiento

fue significativo en todos los intervalos de tiempo, excepto en el primero (60-70 min:  $F_{(3, 36)} = 2,77$ ,  $p = \text{ns}$ ; 70-80 min :  $F_{(3, 36)} = 7.57$ ,  $p < 0,000$ ; 80-90 min:  $F_{(3, 36)} = 18.88$ ,  $p < 0,000$ ; 90-100 min:  $F_{(3, 36)} = 7.45$ ,  $p < 0,001$ ; 100-110 min:  $F_{(3, 36)} = 3.80$ ,  $p = 0,018$ ). Comparaciones múltiples *post-hoc* revelaron que en el intervalo de 70 a 110 minutos, los ratones inyectados con las dosis más altas de quinpirole aparece un número significativamente mayor de saltos en comparación con otros grupos (figura 2A).

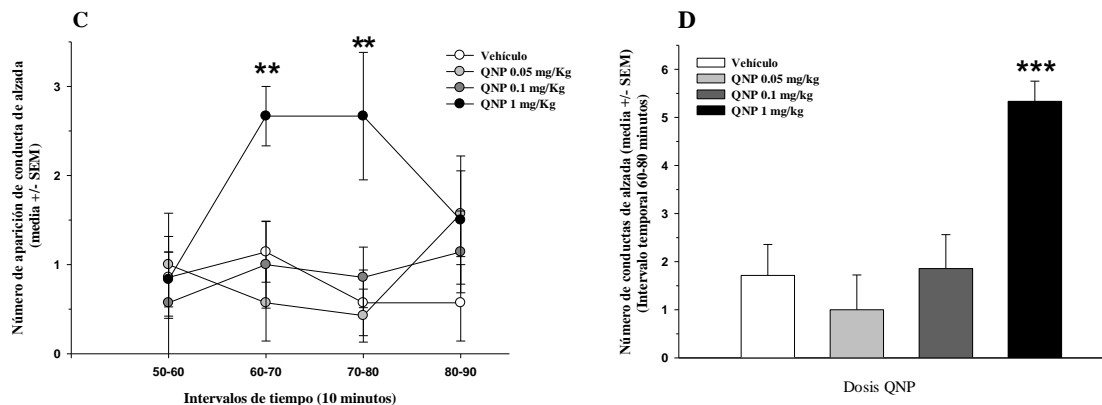
Al observarse diferencias significativas entre 70 y 110 minutos, se realizó ANOVA de una vía sobre el número total de saltos en ese intervalo de tiempo. El efecto principal del tratamiento fue significativa ( $F_{(3, 36)} = 15.44$ ,  $p < 0,000$ ) y las pruebas *post hoc* demostraron que la administración de quinpirole a 1 mg/kg aumentó significativamente el número de saltos, mientras que las dosis más bajas no lo hicieron (figura 2B).



**Figura 2.** Efectos del tratamiento agudo con quinpirole (QNP) en comportamientos estereotipados de salto medidos en el test de *medición en cilindros* (TMC). **A)** Número de saltos en intervalo temporal de 10 minutos. Grupos con quinpirole 0,05; 0,1 y 1 mg/kg enfatizando la expresión habitual del agonista de receptores dopaminérgicos D2/D3 en intervalos de 60 a 100 minutos. Intervalo específico de tiempo. **B)** Media del número de salto tras la administración de quinpirole 0,05; 0,1 y 1 mg datos acumulados. Los valores corresponden a las medias  $\pm$  E.E.M. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*  $p < 0,05$  vs, resto de grupos.

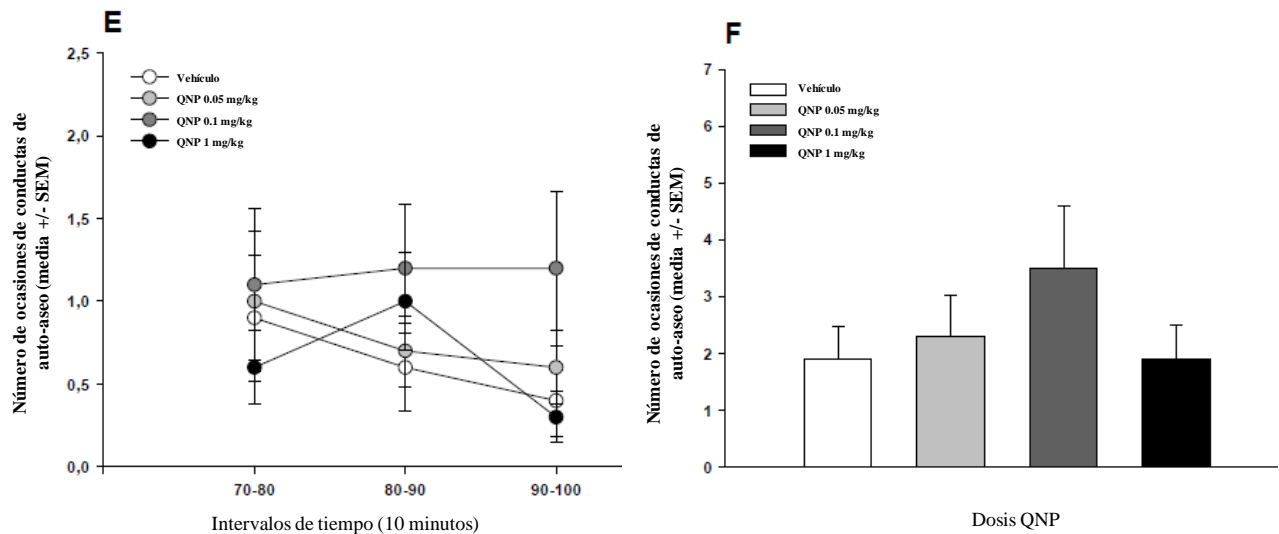
Asimismo, se midió el número de ocasiones en la que aparecía la conducta de alzada en el test de *medición en cilindros*. El análisis de varianza de dos vías realizado entre 50 y 90 minutos indicó que el efecto principal del tratamiento fue significativo ( $F_{(3, 36)} = 4.70$ ,  $p = 0,007$ ), el efecto principal del intervalo de tiempo mostró una fuerte tendencia ( $F_{(3, 108)} = 2.43$ ,  $p = 0,068$ ) y la interacción intervalo de tiempo x tratamiento fue significativo ( $F_{(9, 108)} = 4.83$ ,  $p < 0,000$ ). ANOVA de una vía realizada en cada intervalo de tiempo de 10 minutos mostró que el efecto principal del tratamiento fue significativa en los intervalos de tiempo 60-70 y 70-80 minutos ( $F_{(3, 36)} = 9.90$ ,  $p < 0,000$ ,  $F_{(3, 36)} = 10.65$ ,  $p < 0,000$ , respectivamente). Comparaciones múltiples *post-hoc* revelaron que en

el intervalo de 60 a 80 minutos, los ratones inyectados con 1 mg/kg de quinpirole muestran un número significativamente mayor de conducta de alzada *vs* otros grupos (figura 2C). El análisis de varianza de una vía llevado a cabo sobre los datos de 60 a 80 minutos fue significativa ( $F_{(3, 36)} = 15.94$ ,  $p < 0.000$ ), y las comparaciones múltiples *post hoc* mostraron que la administración de 1 mg/kg de quinpirole aumentó significativamente la aparición de conducta de alzada (figura 2D).



**Figura 2.** Efectos del tratamiento agudo con quinpirole (QNP) en estereotipias de alzada medida test de medición en cilindros. **C)** Aparición de conducta de alzada en intervalos de 10 minutos. Grupos con quinpirole 0,05; 0,1 y 1 mg/kg resaltando la manifestación frecuente del agonista de receptores dopaminérgicos D2/D3 en intervalos de 60 a 100 minutos. Ventana específica de tiempo. **D)** Media de la expresión de conducta de alzada tras la administración de quinpirole 0,05; 0,1 y 1 mg/kg datos acumulados. Los valores corresponden a las medias  $\pm$  E.E.M. \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  *vs.* resto de grupos.

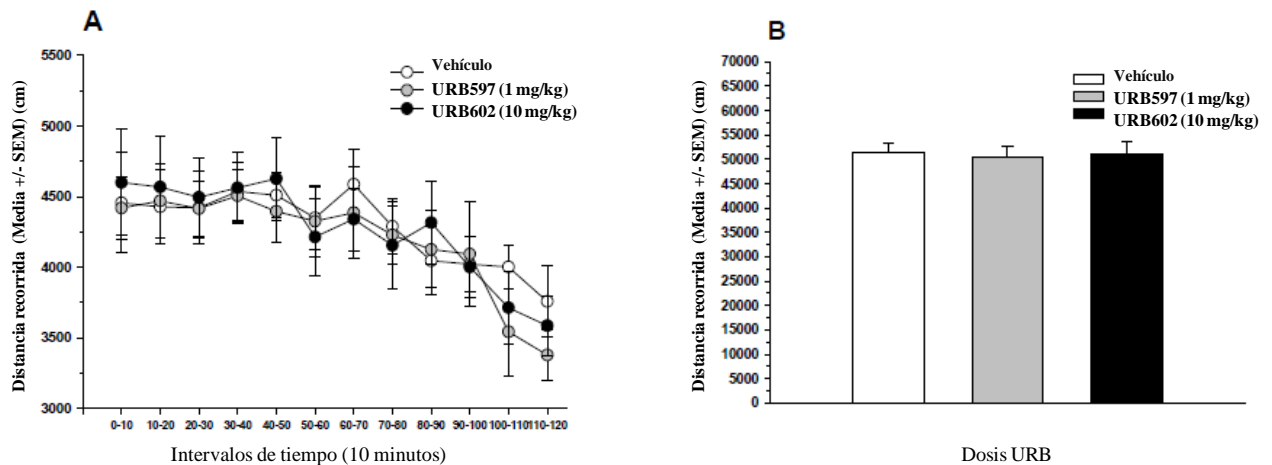
Finalmente, la conducta de acicalamiento fue medida entre 70 y 100 minutos. Los resultados mostraron que ni mediante el análisis por intervalos de tiempo (ANOVA de dos vías, el tratamiento ( $F_{(3, 36)} < 1$ , el intervalo de tiempo:  $F_{(2, 72)} = 1,58$ ,  $p = ns$ , la interacción tratamiento x intervalo de tiempo :  $F_{(6, 72)} < 1$ ), ni mediante el análisis de los datos ( $F_{(3, 36)} < 1$ ) se alcanzaron diferencias significativas (figura 2E y 2F).



**Figura 2.** Efectos del tratamiento agudo con quinpirole (QNP) en comportamientos estereotipados de acicalamiento en el test de *medición en cilindros*. **E)** Número de frecuencia de aparición de conducta de auto-aseo en intervalo temporal de 10 minutos. Grupos con quinpirole 0,05; 0,1 y 1 mg/kg marcando el periodo distintivo del agonista de receptores dopaminérgicos D2/D3 en intervalos de 60 a 100 minutos. Intervalo específico de tiempo. **F)** Media del número de expresiones de conducta de auto-aseo tras la administración de quinpirole 0,05; 0,1 y 1 mg en datos acumulados. Los valores corresponden a las medias  $\pm$  E.E.M.

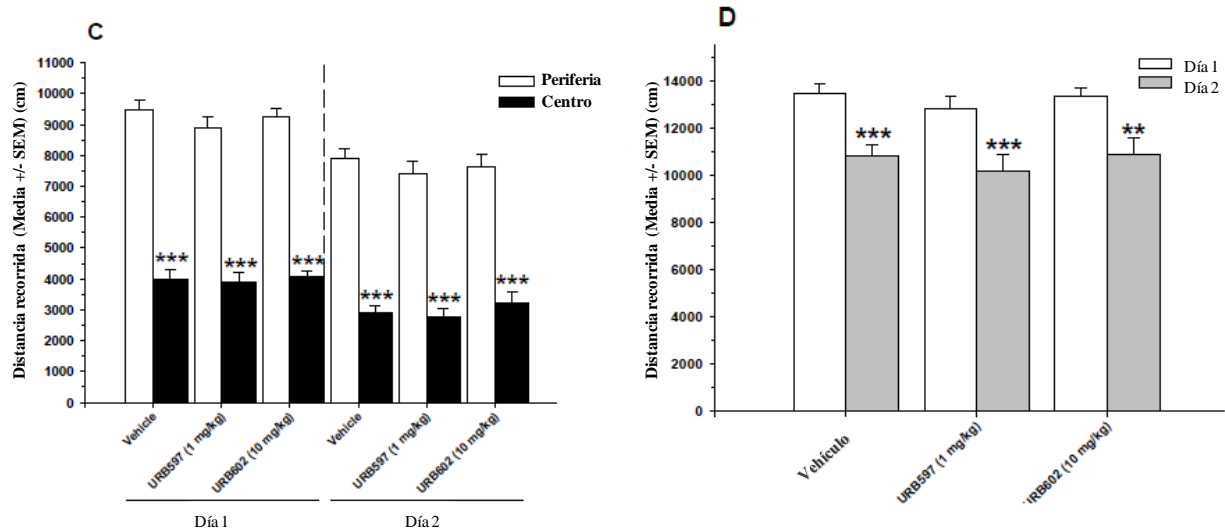
### 3. Los inhibidores FAAH y MAGL no modifica el comportamiento estereotipado, locomoción, ansiedad y/o habituación en animales C57/BI6J.

Con el fin de evaluar los efectos de los inhibidores de FAAH y MAGL sobre la actividad locomotora, ansiedad y habituación, los ratones fueron inyectados con URB 597 (1 mg/kg), URB 602 (10mg/kg) o vehículo. Se probó en dos sesiones con intervalo de 24 horas entre sesiones. La actividad locomotora se evaluó mediante la medición de la distancia recorrida por los ratones durante toda la duración de la primera sesión. ANOVA de dos vías indicó que ni el efecto principal del tratamiento (figura 3B) ni el tiempo de interacción tratamiento x intervalo fue significativa ( $F_{(2, 33)} < 1$ ,  $p = \text{ns}$ ;  $F_{(10, 384, 171.34)} < 1$ ,  $p = \text{ns}$ , respectivamente). Sin embargo, el efecto principal del intervalo de tiempo fue significativa ( $F_{(5, 192, 171.34)} = 7.88$ ,  $p < 0,000$ ). Estos resultados señalan que todos los grupos mostraron el mismo nivel de actividad locomotora y reduciéndose progresivamente en la misma forma que con el tiempo (dentro de la sesión de habituación) (figura 3A).



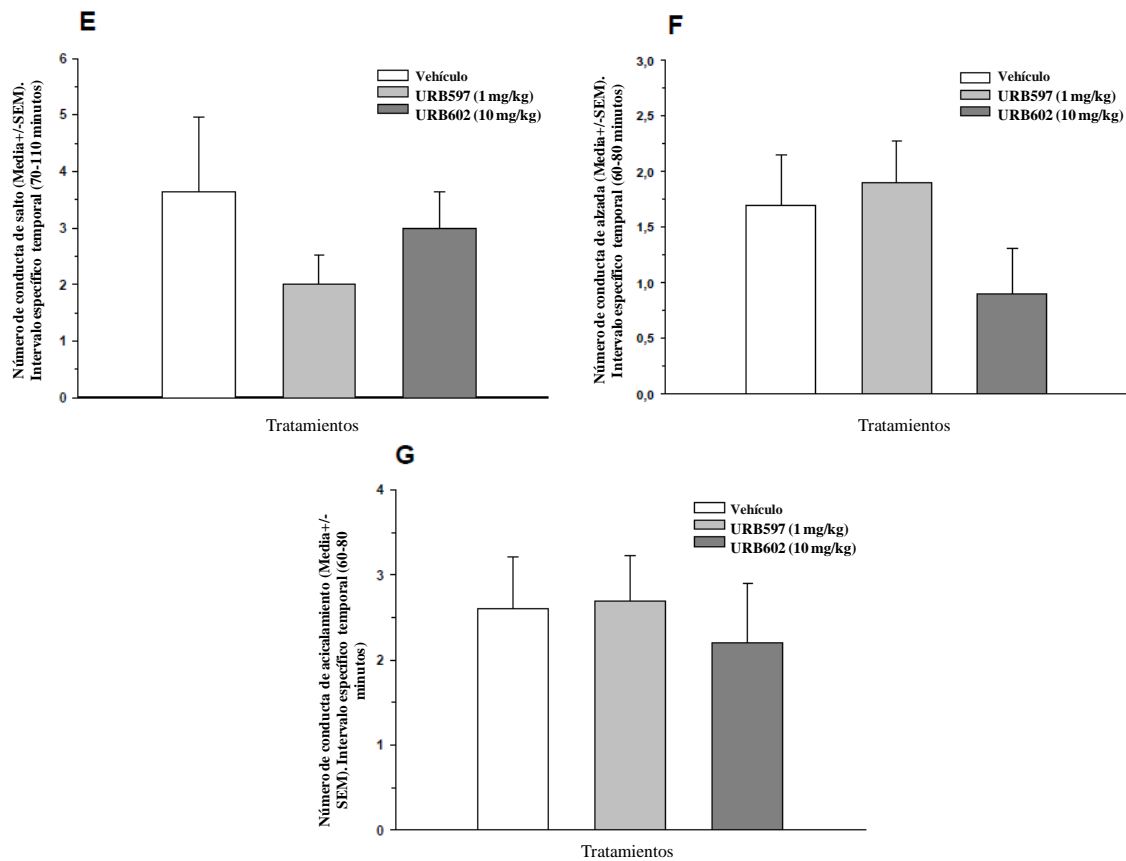
**Figura 3.** Efectos de la administración de inhibidores de enzimas de degradación, FAAH (URB 597, 1 mg/kg) o MAGL (URB 602, 10 mg/kg) en la actividad locomotora, ansiedad y estereotipias al campo abierto. **A)** Actividad locomotora, en intervalos de tiempo. **B)** Actividad locomotora en datos acumulados, en campo abierto. Los valores corresponden a las medias  $\pm$  E.E.M.

Para determinar si los tratamientos con inhibidores de FAAH y MAGL tenían algún efecto sobre los niveles de ansiedad y la habituación entre sesiones, se midió la distancia recorrida por los ratones en la periferia y zona central del campo abierto durante los primeros 30 minutos de las dos sesiones. ANOVA de tres vías con el tratamiento (vehículo, URB 597 y URB 602) así como con el factor sujetos y la zona (periferia o el centro) y día (primero o segundo) como el factor sujetos, indicaron que el efecto principal del tratamiento no fue significativo ( $F_{(2, 33)} < 1$ ,  $p = ns$ ). Sin embargo, los efectos principales de la zona y día fueron significativas ( $F_{(1, 33)} = 954.70$ ,  $p < 0.000$ ,  $F_{(1, 33)} = 59.83$ ,  $p < 0.000$ , respectivamente). Ni la interacción tratamiento x zona, ni la interacción tratamiento x día, ni la interacción zona x día x tratamiento fueron significativas ( $F < 1$  en todos los casos). Las pruebas *post hoc* demostraron que todos los grupos mostraron niveles significativamente más altos de la actividad locomotora en la zona de la periferia del campo abierto en comparación con la actividad locomotora en la zona central (figura 3C). Asimismo, durante la segunda sesión todos los grupos mostraron niveles significativamente más bajos de actividad locomotora en comparación con el primer período de sesiones (figura 3D).



**Figura 3.** Efectos de la administración de inhibidores de enzimas de degradación, FAAH (URB 597, 1 mg/kg) o MAGL (URB 602, 10 mg/kg) en la actividad locomotora, ansiedad y estereotipias al campo abierto. **C)** Exploración de zonas periféricas vs. zona central en campo abierto ( $^{***}p < 0,001$  en comparación con la zona periférica). **D)** Respuesta en el desarrollo de habituación al OF. Novedad del medio (día 1) en comparación con la familiaridad (día 2) ( $^{**}p < 0,01$  en comparación con el día 1). Los valores corresponden a las medias  $\pm$  E.E.M.

Finalmente, para analizar si los inhibidores de FAAH y MAGL tuvieron algún efecto en los comportamientos estereotipados, se usó un subconjunto de ratones que fueron inyectados con URB597 (1 mg/kg), URB602 (10 mg/kg) o vehículo y evaluados en el test de *medición en cilindros* durante dos horas. Se cuantificaron los comportamientos estereotipados en los intervalos de tiempo específicos en los que el quinpirole demostró aumentar significativamente la locomoción y los comportamientos estereotipados (figura 1A-F y figura 2A-F). ANOVA de una vía mostró que ninguno de los grupos diferían en el número de saltos, alzada o aseo personal ( $F_{(2, 27)} < 1$ ,  $p = ns$ ;  $F_{(2, 27)} = 1,64$ ,  $p = ns$ ;  $F_{(2, 27)} < 1$ ,  $p = ns$ , respectivamente) (figura 3E-G). Estos resultados nos llevan a concluir que el tratamiento con inhibidores de FAAH o MAGL no modifica la actividad locomotora, ansiedad, habituación y comportamientos estereotipados en ratones C57/BI6J.

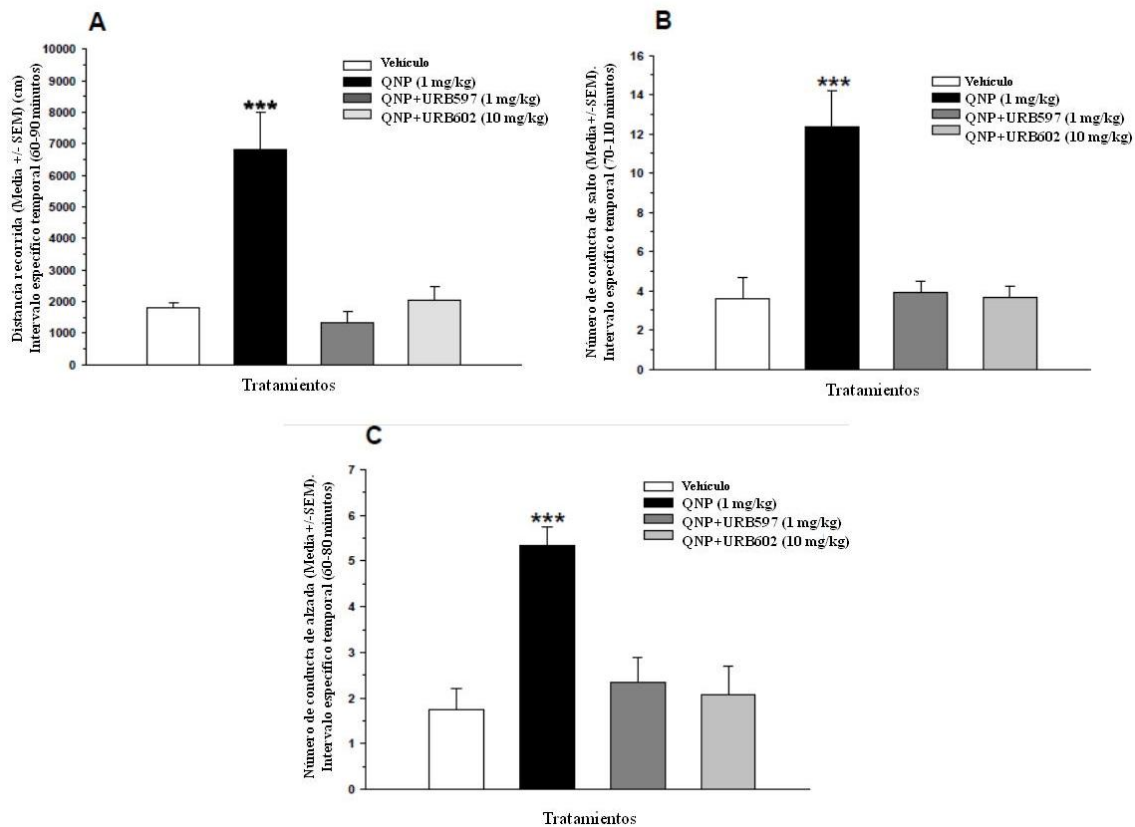


**Figura 3.** Efectos de la administración de inhibidores de enzimas de degradación, FAAH (URB 597, 1 mg/kg) o MAGL (URB 602, 10 mg/kg) en la actividad locomotora, ansiedad y estereotipias al campo abierto. **E)** Estereotipia de salto **F)** Conducta estereotipada de alzada **G)** y estereotipia de acicalamiento, medidas todas ellas en el test de *medición en cilindros*. Los valores corresponden a las medias  $\pm$  E.E.M.

#### 4. Administración de inhibidores de FAAH y MAGL con quinpirole contrarresta la hiperactividad y estereotipias.

Se evaluó si la administración conjunta de inhibidores de FAAH y MAGL con quinpirole podría contrarrestar la hiperactividad y los comportamientos estereotipados inducidos por quinpirole. Existieron diferentes grupos de ratones, inyectados con vehículo, quinpirole (1 mg/kg) o co-administrado con quinpirole y URB597 (1 mg/kg) o quinpirole y URB602 (10 mg/kg) y evaluadas en campo abierto y el test de *medición en cilindros*. ANOVA de una vía señaló diferencias significativas (distancia recorrida en campo abierto:  $F_{(3, 44)} = 15.71$ ,  $p < 0,000$ ; Número de saltos en *TMC*:  $F_{(3, 44)} = 13.98$ ,  $p < 0,000$ ; Número de conductas de alzada en el *TMC*:  $F_{(3, 44)} = 10.46$ ,  $p < 0,000$ ). Comparaciones múltiples *post-hoc* revelaron que los ratones inyectados con quinpirole mostraron una mayor distancia recorrida y un mayor número de saltos y estereotipia de alzada en comparación con otros grupos (Figura 4A-C). Además, los grupos inyectados con quinpirole+URB597 (1 mg/kg) o quinpirole+URB602 (10 mg/kg) no difieren de los ratones inyectados con vehículo (figura 4A-C). Estos resultados sugieren que la

administración conjunta de inhibidores de FAAH o MAGL junto con quinpirole revocó la hiperactividad y los comportamientos estereotipados inducidos por quinpirole.



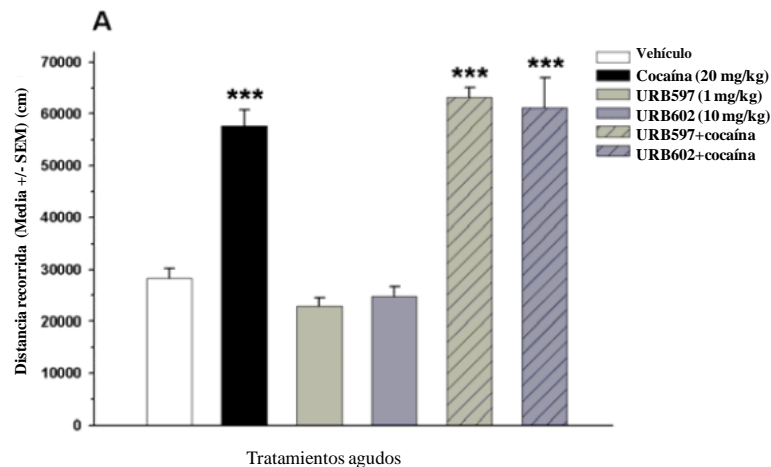
**Figura 4.** Efectos de los inhibidores de FAAH y MAGL en la hiperactividad y estereotipias inducido por quinpirole. **A)** Efecto de un tratamiento previo con inhibidores de FAAH y MAGL en hiperlocomoción inducida por quinpirole en intervalo específico de tiempo en de la prueba, 60-90 minutos. **B)** estereotipias de salto y **C)** de alzada, en el *test de medición en cilindros*. \*\*\*  $p < 0,001$  en comparación con los demás grupos. Los valores representan la media  $\pm$  SEM.

## 5. Efectos de los inhibidores de FAAH y MAGL en la actividad inducida por cocaína.

Dado que la cocaína es un agonista dopaminérgico de acción indirecta, se realizaron una serie de experimentos para estudiar la influencia de los inhibidores de FAAH y MAGL en la respuesta del aparato locomotor provocados por la administración aguda de cocaína, condicionamiento a cocaína, locomoción condicionada y sensibilización a cocaína. En un primer experimento, un grupo de ratones fue inyectado con una sola dosis de cocaína (20 mg/kg), URB597 (1 mg/kg), URB602 (10 mg/kg), vehículo o co-administrado con cocaína y URB597 o URB602. Al realizar ANOVA de una vía, se observó que el efecto principal del tratamiento fue significativo ( $F_{(5, 42)} = 39.10$ ,  $p < 0,000$ ). Pruebas *post-hoc* mostraron que la distancia

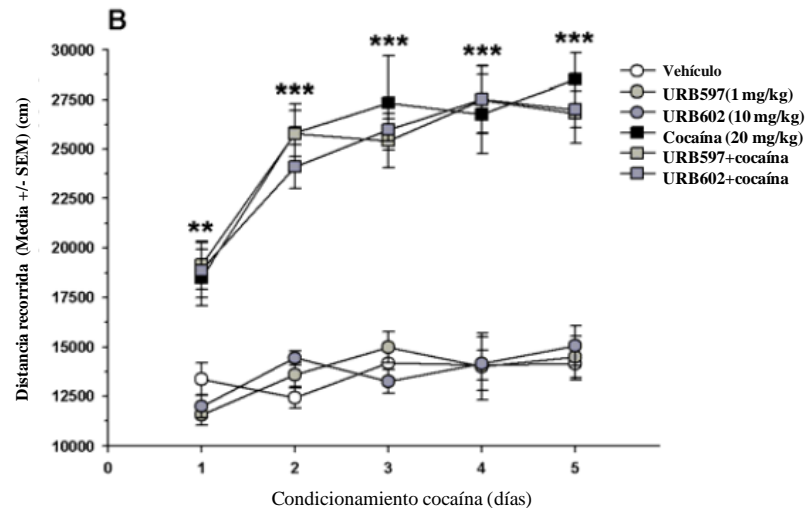


recorrida por los ratones inyectados sólo con cocaína o con cocaína más URB597 o URB602 fue significativamente mayor en comparación con los grupos inyectados con vehículo, URB597 o URB602 (figura 5A). Este resultado sugiere que los inhibidores de FAAH y MAGL no produjeron ningún efecto sobre la respuesta del aparato locomotor inducida por cocaína aguda.



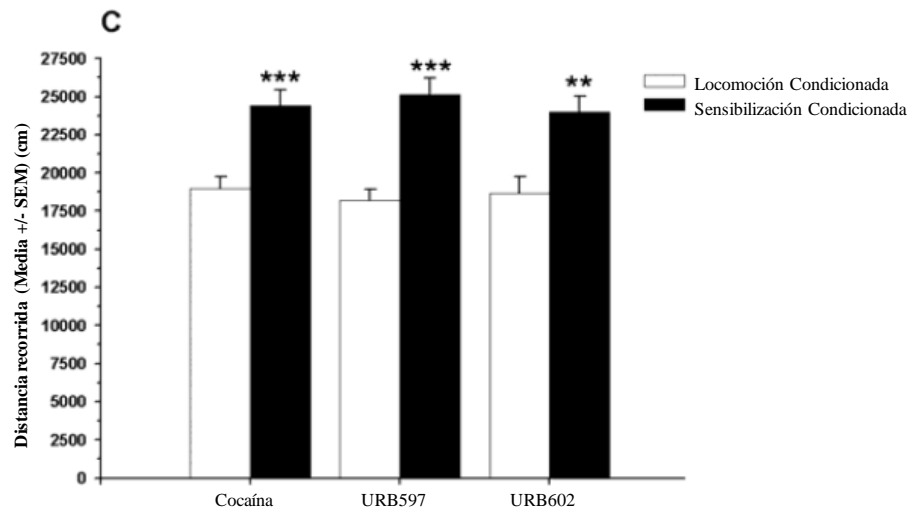
**Figura 5.** Efectos de los inhibidores de FAAH y MAGL en actividad locomotora inducida por cocaína como acción indirecta del agonista dopaminérgico, en la prueba campo abierto. **A)** Efecto del tratamiento agudo previo con inhibidores de FAAH y MAGL en la actividad locomotora aguda inducida por cocaína (\*\* $p < 0,001$  en comparación con los grupos sin inyección aguda de cocaína: vehículo, URB597 1 mg/kg y URB602 1 mg/kg).

En un segundo experimento, otra grupo de animales fue administrado una vez al día durante cinco días consecutivos con cocaína (20 mg/kg), URB597 (1 mg/kg), URB602 (10 mg/kg), vehículo o co-administrado con cocaína y URB597 o URB602. ANOVA de dos vías mostró que los efectos principales del tratamiento, y la interacción tratamiento x día fueron significativos ( $F_{(5, 54)} = 63.72$ ,  $p < 0.000$ ,  $F_{(3,06, 165,30)} = 31,36$ ,  $p < 0.000$ ,  $F_{(15,30, 165,30)} = 3.38$ ,  $p < 0.000$ , respectivamente). Con ANOVA de una vía para cada día, (Día 1:  $F_{(5, 54)} = 11.30$ ,  $p < 0,000$ ; día 2:  $F_{(5, 54)} = 56.91$ ,  $p < 0.000$ ; día 3:  $F_{(5, 54)} = 31.88$ ,  $p < 0,000$ ; día 4:  $F_{(5, 54)} = 25.21$ ,  $p < 0,000$ ; día 5:  $F_{(5, 54)} = 41.07$ ,  $p < 0,000$ ). Comparaciones múltiples *post-hoc* revelaron que la distancia recorrida por los ratones inyectados sólo con cocaína o inyectados con URB597 o URB602 más cocaína fue significativamente una distancia recorrida mayor que por los ratones administrados con URB597 o URB602 o vehículo (figura 5B).



**Figura 5.** Efectos de los inhibidores de FAAH y MAGL en actividad locomotora inducida por cocaína como acción indirecta del agonista dopaminérgico, en la prueba campo abierto. **B)** Efecto de la administración conjunta con inhibidores de FAAH y MAGL en condicionamiento repetido a cocaína (\*\* $p < 0,001$  y \* $p < 0,01$  en comparación con grupos control sin co-administración repetida a cocaína).

Estos resultados nos llevan a concluir que los inhibidores de enzimas de degradación (URB597-602) no produjeron ningún efecto en el condicionamiento a cocaína. A continuación, los animales se dejaron en reposo durante cinco días consecutivos y 24 horas más tarde los grupos previamente condicionados con cocaína fueron inyectados con vehículo y expuestos a evaluar la respuesta de locomoción condicionado. 24 horas más tarde, los ratones de los mismos grupos fueron inyectados con una dosis principal de cocaína (10 mg/kg) y se evaluó la sensibilización a cocaína comparando la distancia recorrida por los ratones después de la inyección de la dosis principal de cocaína con la distancia recorrida mostrada en días previos (locomoción condicionada). ANOVA de dos vías indicó que los efectos principales del pre-tratamiento (cocaína, cocaína+URB597, o cocaína+URB602) y la interacción de pre-tratamiento x protocolo (locomoción condicionada o sensibilización a cocaína) no fueron significativas ( $F_{(2, 27)} < 1$  en ambos casos). Por el contrario, el efecto principal del protocolo fue significativo ( $F_{(1, 27)} = 121,02$ ,  $p < 0,000$ ). Pruebas *post-hoc* mostraron que en los tres grupos fueron significativamente mayor la distancia recorrida durante el período de sesiones de sensibilización a cocaína durante la sesión de la locomoción condicionada (figura 5C).

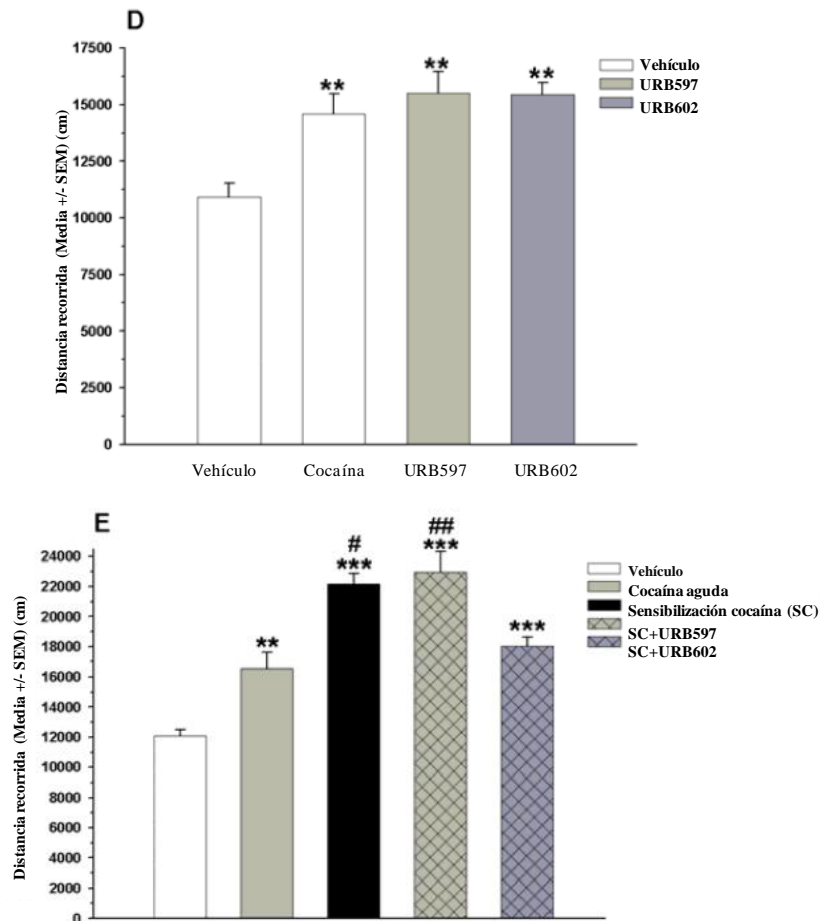


**Figura 5.** Efectos de los inhibidores de FAAH y MAGL en actividad locomotora inducida por cocaína como acción indirecta del agonista dopaminérgico, en la prueba campo abierto. **C)** Efecto del tratamiento previo con inhibidores de FAAH y MAGL en la locomoción condicionada inducida por cocaína (LC) y sensibilización conductual (SC) (\* $p < 0,001$  y \*\* $p < 0,01$  en comparación con grupos de la locomoción condicionada).

Estos resultados sugieren que la administración de inhibidores de FAAH y MAGL durante el condicionamiento a cocaína no afecta al desarrollo de la locomoción condicionada y sensibilización a cocaína.

Además, se realizó otro experimento para estudiar los efectos de la administración aguda de FAAH y MAGL en la locomoción condicionada y la respuesta a sensibilización con cocaína. Los grupos de ratones fueron condicionados con cocaína (20 mg/kg) o tratados con vehículo durante cinco días consecutivos (datos no mostrados). Cinco días después de terminar el protocolo de condicionamiento de un subconjunto de ratones fueron tratados con vehículo, URB597 (1 mg/kg) o URB602 (10 mg/kg) y expuestos a campo abierto. ANOVA de un factor ( $F_{(3, 36)} = 8.07$ ,  $p < 0.000$ ), seguido de pruebas *post-hoc* indicaron que los ratones condicionados con cocaína muestran una distancia recorrida significativamente mayor que los ratones tratados previamente con vehículo (figura 5D). Por otra parte, los ratones previamente condicionados con cocaína y tratados de forma aguda con URB597 o URB602 también mostraron una distancia recorrida significativamente mayor que los ratones tratados previamente con vehículo (figura 5D). Para la evaluación de la SC, otro subconjunto de animales previamente condicionados con cocaína recibieron una inyección principal de cocaína (10 mg/kg) con o sin inyección aguda de URB597 o URB602, mientras que los ratones tratados previamente con vehículo recibieron una inyección aguda de cocaína o

vehículo de nuevo. Los ratones que recibieron una administración aguda del inhibidor de MAGL, URB602, no desarrollaron respuesta de sensibilización (ANOVA de un factor ( $F_{(4, 45)} = 24.93$ ,  $p < 0.000$ ), (figura 5E). No ocurriendo lo mismo en el caso de los ratones que fueron inyectados con una dosis aguda del inhibidor de FAAH, URB597.



**Figura 5.** Efectos de los inhibidores de FAAH y MAGL en actividad locomotora inducida por cocaína, en la prueba campo abierto. **D-E)** Efecto de la administración de inhibidores de FAAH y MAGL en la locomoción inducida por condicionamiento a cocaína y sensibilización conductual, respectivamente (\*\* $p < 0.001$ ; \* $p < 0.01$  vs grupo control. ## $p < 0.01$ ; # $p < 0.05$  vs grupo de cocaína aguda). Los valores representan la media  $\pm$  SEM.

Esto indica que el tratamiento agudo con URB no modifica la respuesta de locomoción condicionada.



## DISCUSIÓN ESTUDIO 1.

En los últimos años, los resultados científicos han establecidos un papel para el sistema endocannabinoide como modulador de la transmisión de dopamina en los ganglios basales (Piomelli y Giuffrida, 2000; Rodríguez de Fonseca, *et al.*, 1998). El desarrollo de inhibidores de la degradación de endocannabinoides ha abierto una nueva alternativa para el desarrollo estrategias terapéuticas basadas en endocannabinoides en los trastornos relacionados con la dopamina (Piomelli, 2003; Espejo, *et al.*, 2009). Con el fin de caracterizar los efectos de los inhibidores en comportamientos mediados por dopamina, en primer lugar hay que caracterizar el funcionamiento del comportamiento de los animales tratados con el agonista de los receptores de dopamina D2/D3, quinpirole y, posteriormente, se estudian los efectos farmacológicos de estos inhibidores en comportamientos inducidos por quinpirole o cocaína.

Los resultados demuestran que: 1) El quinpirole produce una respuesta bifásica (Eilam y Szechtman, 1989; Meyer, *et al.*, 1992; Van Hartesveldt, *et al.*, 1994, 1997; Beltramo, *et al.*, 2000; Shaldubina, *et al.*, 2002; Szumlinski, *et al.*, 2002) en la locomoción en ratones y un incremento dependiente de la dosis en los comportamientos estereotipados. 2) La inhibición de FAAH o MAGL eliminó el incremento de la locomoción observado después de una dosis alta de quinpirole, y suprimió la inducción de comportamientos estereotipados y, por último, c) La inhibición de ambas enzimas no afectó a las acciones psicomotoras de la cocaína ni a la adquisición de sensibilización. Sin embargo, el bloqueo de la degradación de 2-AG redujo la expresión de la sensibilización inducida por la cocaína ya adquirida, cuando se analizaron 7 días después de su inducción. En general, los presentes resultados indican que la inhibición de degradación de ligandos endógenos cannabinoides tienen un potente efecto inhibidor de los efectos estimulantes mediados por receptores de dopamina D2 en los comportamientos, pero muy limitado en los efectos psicoestimulantes máximos de la cocaína.

La activación de receptores de dopamina D2 se han caracterizado en roedores de laboratorio y primates. Este agonista de dopamina produce una marcada disminución en la actividad motora por la inhibición de la liberación de dopamina de las terminales dopaminérgicas que se proyectan hacia los ganglios basales. Los efectos están mediados por los receptores D2 de dopamina a nivel presináptico (Davis, *et al.*, 1997). A pesar de

---

este efecto inhibitorio, la estimulación de los receptores de dopamina D2 a nivel postsináptico produce hiperlocomoción y comportamientos estereotipados característicos como saltar, trepar y los movimientos propios de acicalamiento. Así, en ratas, una dosis alta de quinpirole produce primero un componente típico inhibitorio sobre la conducta, seguida por una activación temporal de locomoción y estereotipias (Eilam, *et al.*, 1992; Rodríguez de Fonseca, *et al.*, 1994). Caracterizamos la respuesta en ratones C57BL/6J. Como se muestra en la figura 1, sólo la dosis alta de quinpirole produce el componente de estimulación en el movimiento después del efecto depresor inicial. Este incremento en la locomoción contrasta con la inducción de la habituación al campo abierto que puede verse en el grupo tratado con vehículo. Esta activación del comportamiento es transitoria y se ve acompañado de conductas características de salto y de alzada, pero no de acicalamiento (comportamiento mediado por el receptor de dopamina D1) como se muestra en la figura 2. Sobre la base de estos resultados se seleccionaron las dosis de quinpirole de 1 mg/kg, y el intervalo de 60-120 minutos de tiempo para analizar las acciones de los inhibidores de la degradación de los endocannabinoides. Se utilizan inhibidores con dosis que no produjeron efectos depresores a nivel motor, pero inhibe totalmente la actividad enzimática (Figura 3) (Hohmann, *et al.*, 2005; Kathuria, *et al.*, 2003; Luchicchi, *et al.*, 2010). Esta abolición apoya el papel de contrarregulación para la señalización endocannbinoide mediada por el receptor D2 de dopamina. Esto indica que el aumento en AEA y en 2-AG como resultado del bloqueo de su degradación, es suficiente para eliminar el componente estimulador derivado de la activación del D2. Hallazgos similares han sido descritos para el transporte del inhibidor de la AEA, AM404 (Beltramo, *et al.*, 2000). Este hallazgo podría tener consecuencias importantes para la terapéutica, especialmente con respecto a la esquizofrenia y la enfermedad de Parkinson.

En primer lugar, las discinesias y los comportamientos estereotipados asociados con la estimulación repetida de los receptores de dopamina D2, ya sea en el contexto del tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Ferrer, *et al.*, 2003 y 2007) o en el contexto de abuso de psicoestimulantes (Gorriti, *et al.*, 1999.; Rodríguez de Fonseca, *et al.*, 2003) puede estar notablemente atenuado con estos compuestos que son ansiolíticos, pero no sedantes (Kathuria, *et al.*, 2003; Hohmann, *et al.*, 2005).

---

En segundo lugar, los síntomas positivos de la esquizofrenia, que depende de la activación de los receptores de dopamina D2 están inversamente correlacionados con CSF AEA (Giuffrida, *et al.*, 2004) podría ser atenuado con este tipo de compuestos.

Mecanísticamente hablando, estos efectos sobre las respuestas mediada por el receptor de dopamina D2 se puede atribuir a endocannabinoides liberados a través de la activación de los receptores D2. AEA o 2-AG puede actuar en varios lugares en los circuitos de los ganglios basales a través de la participación de los receptores cannabinoides CB1: se puede controlar la liberación de dopamina presináptica (O'Neill, *et al.*, 2009). Probablemente a través de acciones transinápticas, ya que pueden regular la transmisión dopaminérgica, probablemente a través de la interacción con los receptores CB1 y dímeros formados con los receptores de dopamina D2 o receptores de adenosina A2A (Navarro, *et al.*, 2008) o mediante la regulación de los receptores de dopamina D2 (Crunelle, *et al.*, 2011), y claramente se puede actuar regulando la transmisión corticostriatal glutamatérgica (Adermark y Lovinger, 2007; Adermark, *et al.*, 2009; Gerdeman y Lovinger, 2001).

Sin embargo, las acciones de estos inhibidores de degradación de endocannabinoides no se puede extender al componente motor de la adicción a psicoestimulantes, especialmente en el caso de la cocaína (Figura 5). A pesar de que se ha establecido claramente el papel de los cannabinoides endógenos en la adicción (Colombo, *et al.*, 2005; Ledent, *et al.*, 1999; Maldonado y Rodríguez de Fonseca de 2002, Scherma, *et al.*, 2008; Solinas, *et al.*, 2007 y 2008) no hay un consenso general sobre el papel del sistema endocannabinoide en la adicción a cocaína (Arnold, 2005; de Vries, *et al.*, 2001; Li, *et al.*, 2010). La adquisición de autoadministración de cocaína y la sensibilización parece ser casi independiente de receptores cannabinoides CB1. En el presente estudio la inhibición de FAAH o MAGL no afectó en las acciones psicomotoras aguda de cocaína, no impidió atenuar la adquisición de sensibilización conductual, ni afectó la expresión de la locomoción condicionada. Sólo hemos encontrado una disminución inducida por inhibidores MAGL en la expresión de varios días de sensibilización de cocaína después de la última dosis de cocaína. Si estos efectos selectivos reflejan el estado dependiente de los cambios en la transmisión de dopamina inducida por cocaína (Chefer y Shippenberg, 2002), las adaptaciones diferenciales en la señalización de 2-AG y AEA, que son funcionalmente segregada (Placzek, *et al.*, 2008),

---



o las acciones selectivas 2-AG en la plasticidad del cuerpo estriado asociados con la exposición repetida de cocaína aún no se han visto determinada de forma concluyente.

## CONCLUSIONES ESTUDIO 1.

El sistema endocannabinoide es un importante modulador de la transmisión dopaminérgica, y su papel en el control psicomotor está ganando relevancia. La activación de los receptores D2 se asocia con la liberación de endocannabinoides, que actúan como agonistas de los receptores CB1 modulando la plasticidad sináptica en los circuitos motores. El presente estudio fue diseñado para investigar más a fondo el papel de la inhibición de la degradación de los endocannabinoides en la actividad locomotora y comportamientos estereotipados inducidos por el agonista de dopamina D2, quinpirole y por agonistas indirectos, sensibilización conductual inducidos por cocaína en ratones C57BL/6J. Se comparó la inhibición de AEA a través de la degradación amida hidrolasa de ácido grasos (FAAH) y 2-araquidonoil glicerol (2-AG) a través de la monoacilglicerol lipasa (MAGL). La administración de quinpirole (1 mg/kg) causó una respuesta temporal bifásica diferenciando la inmovilidad (0-50 minutos) de la hiperlocomoción (siguientes 70 minutos) asociándose con el surgimiento de comportamientos estereotipados (salto y conducta de alzada). El tratamiento previo con inhibidores de enzimas de degradación de FAAH (URB597, 1 mg/kg) y MAGL (URB602, 10 mg/kg) produjo una fuerte disminución en hiperlocomoción y comportamientos estereotipados inducidos por quinpirole. Sin embargo, la administración conjunta de inhibidores de la FAAH o MAGL con el agonista dopaminérgico indirecto cocaína no atenuó los efectos agudos de la cocaína. Ninguno de los inhibidores tuvo efecto en la adquisición de sensibilización conductual inducida por cocaína y locomoción condicionada. Sin embargo, el inhibidor MAGL (URB602, 10 mg/kg) disminuyó significativamente la expresión de la sensibilización conductual adquirida inducida por cocaína.

En resumen, el presente estudio demuestra que la inhibición de las enzimas de degradación (FAAH y MAGL) de los endocannabinoides atenúa la activación conductual mediada por receptores de dopamina D2, un hallazgo que podría ser relevante para la terapia neuropsicofarmacológica de trastornos relacionados con hiperactividad/estereotipias mediadas por dopamina, como es el caso de las disquinesias o los síndromes de hiperactividad (TDAH, parkinson...).

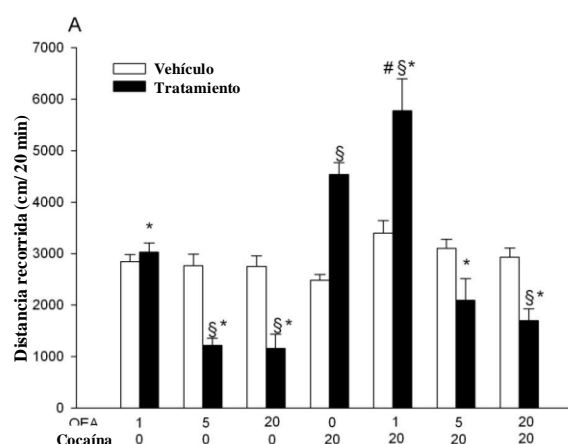
---



## ESTUDIO 2. La oleoiletanolamida atenúa de modo dosis-dependiente los comportamientos inducidos por cocaína a través de un mecanismo independiente del receptor de PPAR $\alpha$ .

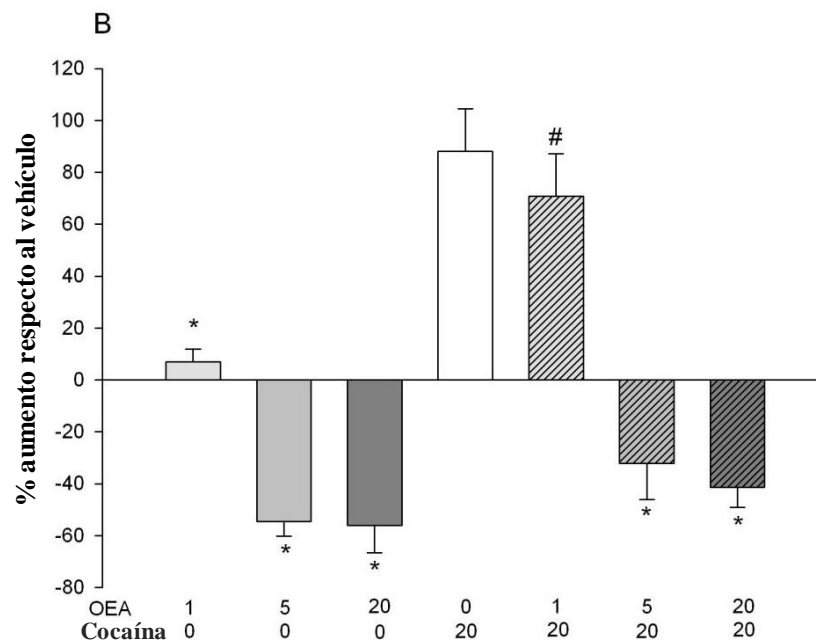
### 1. Efectos de la interacción OEA-cocaína en locomoción aguda.

En paralelo a los experimentos con CLP, se midieron los efectos de la actividad del aparato locomotor con OEA sólo o en combinación con cocaína (Figura 1A). El análisis estadístico mostró un efecto motor x tratamiento ( $F_{(6, 52)} = 28,8$ ,  $p < 0,001$ ). El primer día de condicionamiento con la dosis más baja de OEA (1 mg/kg) no se vio afectada la actividad locomotora, los animales mostraron una respuesta similar a la locomoción del día de condicionamiento con solución salina (post-hoc, *Newman Keuls*,  $p = 0,8$ ). Por otro lado, las dosis de OEA a 5 y 20 mg/kg, disminuyeron significativamente la locomoción respecto al grupo control con solución salina (post-hoc *Newman Keuls*,  $p < 0,001$ ). Como podía ser previsible, la administración aguda de cocaína 20 mg/kg produjo un fuerte incremento en la actividad locomotora ( $p < 0,001$  vs. control). Mientras que la administración conjunta de OEA 1 mg/kg con cocaína no afectó a la respuesta de cocaína y los animales mostraban una actividad motora significativamente más alta, en comparación con la administración de solución salina ( $p < 0,001$ ), las dosis mayores de OEA, 5 y 20 mg/kg bloquearon la locomoción inducida por cocaína. Por otra parte, análisis *post-hoc* revelan un descenso casi significativo en la locomoción de animales tratados con OEA 5mg/kg más cocaína ( $p = 0,05$ ) y una disminución significativa en el caso de la administración de OEA 20 mg/kg más cocaína ( $p < 0,01$ ) respecto al grupo control.



**Figura 1A.** Efectos en la locomoción de OEA a dosis de 1, 5 y 20 mg/kg, administrada sola o en combinación con cocaína (20 mg/kg) vs. control (NaCl 0,9%) \* $p < 0,01$  vs. cocaína 20 mg/kg, § $p < 0,001$  vs. control; # $p < 0,05$  vs OEA 1mg/kg.

Al analizar el porcentaje de aumento y/o disminución de la actividad de cada grupo durante la sesión del primer día de condicionamiento con las sustancias evaluadas, ANOVA de una vía, reveló un efecto del tratamiento ( $F_{(6, 52)} = 28,3$ ;  $p < 0,001$ ). Como se muestra en la figura 1B, la administración conjunta de OEA 1 mg/kg con cocaína, produjo un aumento similar en la locomoción como cocaína sola ( $p = 0,3$ ). Sin embargo, la administración de OEA, 5 ó 20 mg/kg produjo un descenso similar y no significativo en la activación del aparato locomotor, bien cuando se administró solo o en combinación con la cocaína (*Newman Keuls*,  $p > 0,05$  en todos los casos). Por lo tanto, las dosis efectivas de OEA (5 y 20 mg/kg) también son capaces de suprimir el efecto de la activación del aparato locomotor tras administración aguda de cocaína.

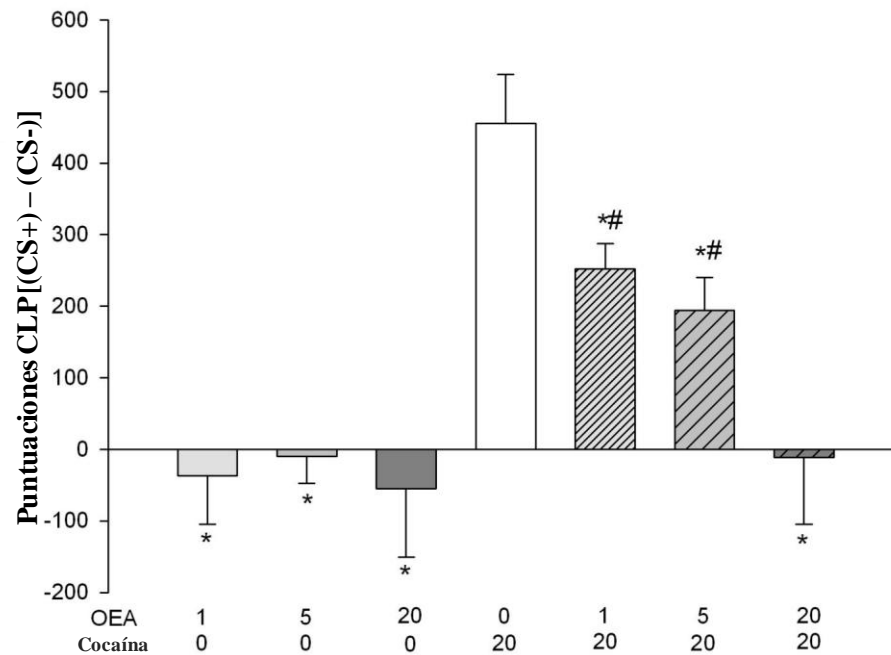


**Figura 1B.** Porcentaje de aumento-disminución de la locomoción, respecto al grupo control (solución salina).

## 2. Efecto de la OEA en CLP inducido por cocaína.

Se evaluaron los efectos de la OEA, en condicionamiento de lugar preferencial, con dosis de 1, 5 y 20 mg/kg i.p. La OEA, por sí sola no indujo ningún tipo de preferencia o aversión cuando se inyectó sola, con dosis de 1, 5 ó 20 mg/kg (Figura 2). Sin embargo, OEA a dosis de 1 y 5 mg/kg, atenuó el condicionamiento de lugar preferencial inducido por cocaína, mientras que con una dosis de 20 mg/kg de OEA, lo suprimió por completo ( $F_{(6, 52)} = 10,3$ ,  $p < 0,001$ ). Como se puede observar en la figura 1, cuando se administró OEA (1 y 5 mg/kg) junto con cocaína durante las sesiones de

condicionamiento, dio lugar a una respuesta del CLP, que fue significativamente menor en comparación con los animales tratados con cocaína (post-hoc de *Newman Keuls*  $p < 0,001$ ), pero significativamente mayor respecto a los ratones tratados solo con OEA (post hoc *Newman Keuls*  $p < 0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas entre OEA a dosis de 20 mg/kg y OEA20 más CLP inducido por cocaína ( $p = 0,8$ ), lo que indica que la cocaína OEA 20 bloquea el CLP inducido por cocaína.



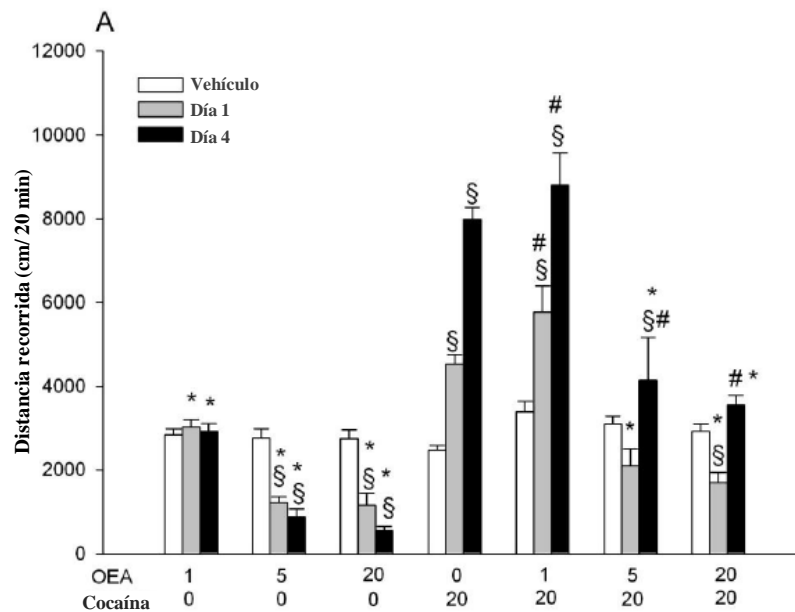
**Figura 2.** Efectos de la administración de OEA a dosis de 1, 5 y 20 mg/kg en CLP inducido por cocaína (20 mg/kg) \* $p < 0,01$  vs. cocaína 20 mg/kg; # $p < 0,01$  vs. OEA del mismo grupo administrada sola.

### 3. Efectos de la OEA en SC inducida por cocaína.

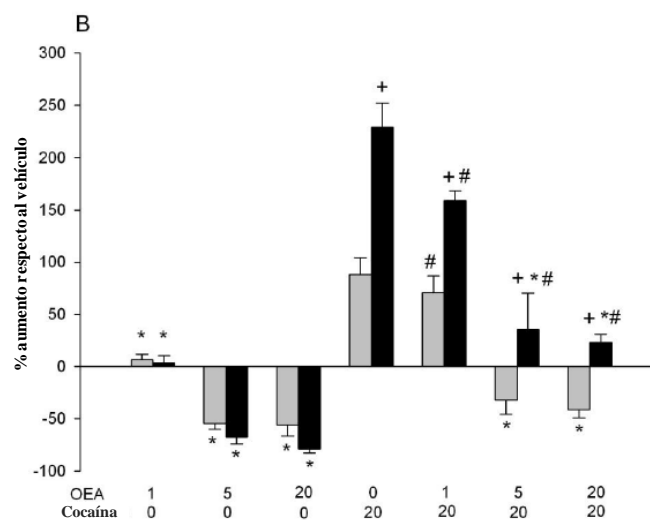
Como se observa en la figura 3 (A), tras la administración repetida de OEA, sola, en cualquiera de las dosis utilizadas (1, 5, 20 mg/kg) se vio que no inducían sensibilización conductual, a pesar de una tendencia a desarrollar algún grado de sensibilización a las dosis de 5 y 20 mg/kg.

La administración de cuatro inyecciones intermitentes de cocaína (20 mg/kg), junto o sin OEA, pero no administrando sólo OEA, produjo una fuerte sensibilización conductual, que se evidenció por la respuesta aumentada de la locomoción, de forma significativa, respecto de la cuarta a la primera inyección (ANOVA de dos vías: efecto de la sensibilización  $F_{(1,52)} = 67,4$ ,  $p < 0,001$ ; efecto del tratamiento  $F_{(6,52)} = 51,9$ ,  $p < 0,001$ ). Sin embargo, la administración conjunta con OEA atenuó esta respuesta (ANOVA de dos vías: efecto sensibilización x tratamiento  $F_{(6,52)} = 18,6$ ,  $p < 0,001$ ). La

coadministración de OEA 1 mg/kg, con cocaína redujo el grado de sensibilización a la cocaína, aunque no alcanzó significación (*Newman Keuls*,  $p = 0,1$ ). Por otro lado, la dosis inicial depresora de la locomoción con OEA (5 y 20 mg/kg), pierde su capacidad de disminuir la respuesta de la locomoción después de cuatro inyecciones de cocaína, probablemente debido al efecto de la sensibilización inducida por la cocaína. Así, en el cuarto día, un aumento significativo (o la falta de disminución) en la respuesta del aparato locomotor pudo observarse en los ratones tratados con 5 u OEA 20mg/kg con cocaína.



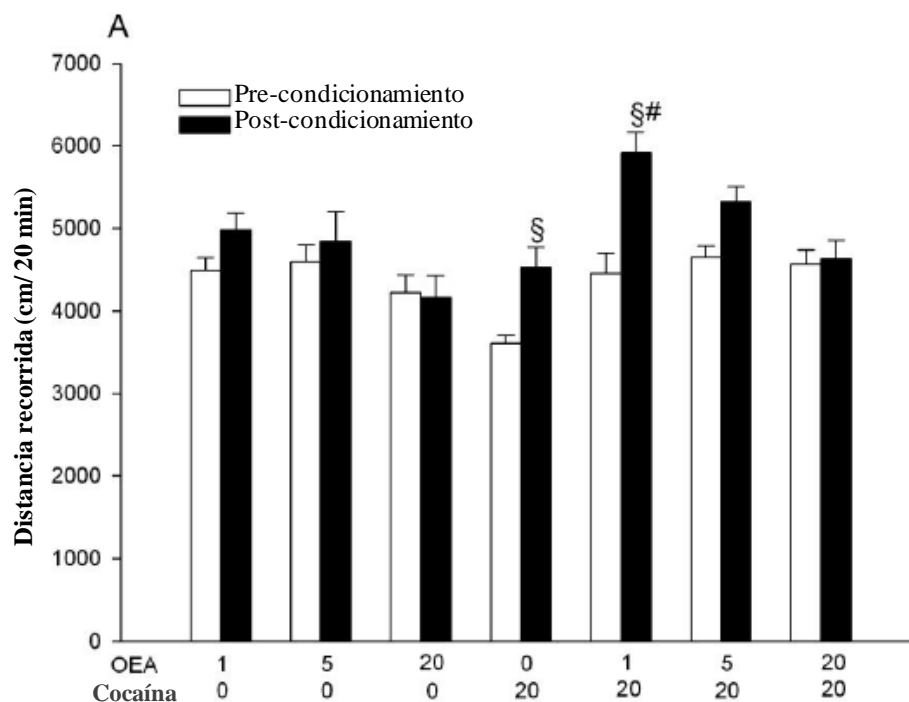
**Figura 3A.** Distancia recorrida en los días 1-4, administrando OEA sola o en combinación con cocaína vs. control (solución salina) \* $p < 0,01$  vs. cocaína 20 mg/kg; # $p < 0,05$  vs. OEA del mismo grupo administrada sola, + $p < 0,01$  vs. día 1, ^ $p < 0,01$  vs. control.



**Figura 3B.** Efectos en la locomoción y porcentaje de aumento-disminución \* $p < 0,01$  vs. cocaína 20 mg/kg; # $p < 0,05$  vs. OEA del mismo grupo administrada sola; + $p < 0,01$  vs. día 1.

#### 4. Efectos de la OEA sobre LC inducida por cocaína.

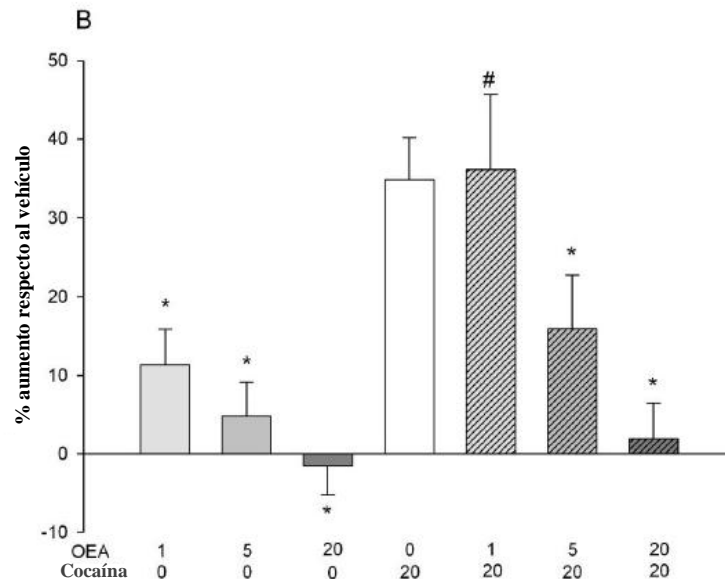
Para evaluar el desarrollo de la locomoción condicionada, se comparó la distancia recorrida en la sesión de condicionamiento previo a la prueba de expresión (Figura 4). Como se ilustra en la figura 4A, sólo el grupo tratado con cocaína mostró una locomoción condicionada clara (ANOVA de dos vías: efecto de locomoción condicionada  $F_{(1,52)} = 40,7$ ,  $p < 0,001$ ). Ninguno de los animales tratados con OEA mostraron locomoción condicionada (ANOVA de dos vías: efecto del tratamiento  $F_{(6,52)} = 4,2$ ,  $p < 0,01$ ), y se pudo observar una relación dosis-efecto en grupos co-administrados con OEA y cocaína (ANOVA de dos vías: efecto de la locomoción condicionada x tratamiento  $F_{(6,52)} = 5,9$ ,  $p < 0,001$ ). Es decir, mientras la administración conjunta de OEA 1 mg/kg no bloqueó la respuesta condicionada inducida por cocaína, OEA 5 mg/kg estuvo cerca de producir significancia, sin embargo, OEA 20 mg/kg bloqueó completamente la respuesta condicionada (post-hoc *Newman Keuls*,  $p = 0,0001$ ,  $p = 0,05$  y  $p = 0,9$ , respectivamente).



**Figura 4A.** Desarrollo de LC, comparando distancia recorrida en sesiones de *pre*-condicionamiento vs. *post*-condicionamiento \* $p < 0,01$  vs. cocaína 20 mg/kg,  $^{\#}p < 0,05$  vs. OEA del mismo grupo administrada sola,  $^{\S}p < 0,01$  vs. control.



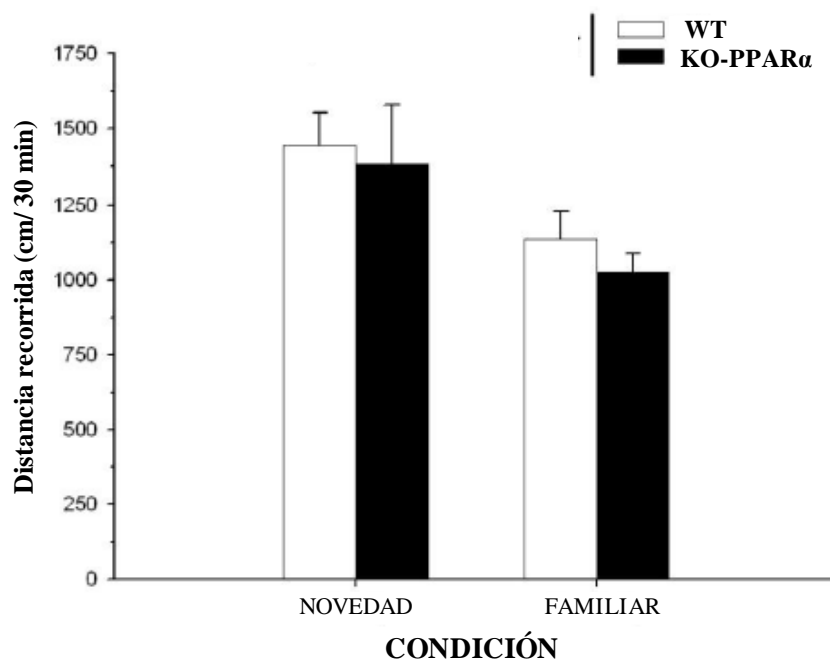
Por otra parte, al comparar el porcentaje de aumento con la actividad locomotora en relación a la sesión de pre-condicionamiento (Figura 4B). ANOVA de una vía, reveló un efecto del tratamiento ( $F_{(6,52)} = 6,7$ ,  $p < 0,001$ ), y todos los grupos, excepto OEA 1 mg/kg más cocaína mostraron diferencias significativas respecto a los animales tratados con cocaína (post-hoc *Newman Keuls*,  $p < 0,05$  en todos los casos).



**Figura 4B.** Comparación de porcentajes de aumento en la locomoción vs. sesiones de precondicionamiento \* $p < 0,01$  vs. cocaína 20 mg/kg, # $p < 0,05$  vs. OEA del mismo grupo administrada sola.

## 5. Exploración de la locomoción en contexto familiar o nuevo en animales WT y KO-PPAR $\alpha$ .

Se analizó la respuesta psicomotora a la familiaridad mediante el análisis de la habituación al campo abierto 24 horas más tarde. La habituación al campo abierto mostró una reducción en la actividad locomotora entre la condición de novedad y familiaridad (ANOVA de dos vías, efecto *condición*:  $F_{(1,13)} = 5,594$ ,  $p < 0,034$ ), pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los ratones KO-PPAR $\alpha$  y WT (ANOVA de dos vías, efecto *genotipo*:  $F_{(1,13)} = 0,547$ ,  $p < 0,473$ ) (Figura 5) y la interacción (ANOVA de dos vías, efecto de la interacción *genotipo x condición*:  $F_{(1,13)} = 0,0460$ ,  $p < 0,834$ ). La distancia recorrida por los dos genotipos disminuyó en campo abierto familiar durante 30 minutos, lo que indica la habituación normal para el medio contextual.



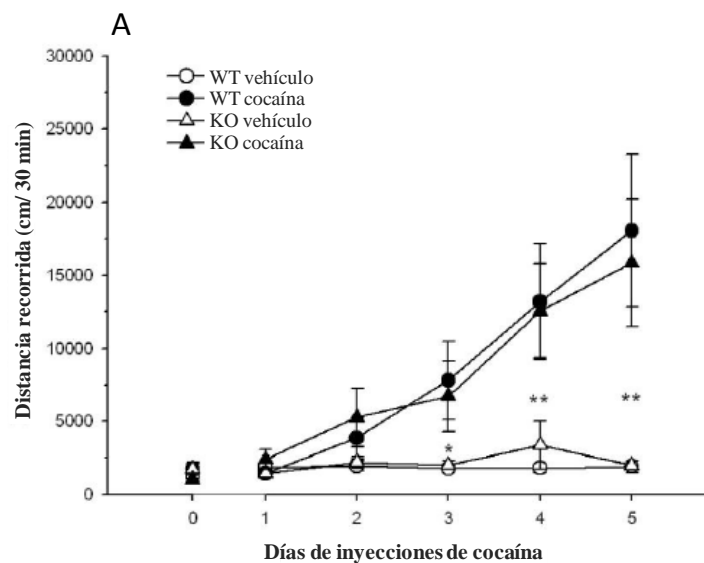
**Figura 5.** Distancia recorrida por ambos genotipos disminuida en campo abierto durante 30 minutos, lo que indica la habituación normal al medio ambiente.

#### 6. Efecto de la cocaína en la LC y SC en ratones KO-PPARα.

Tras la habituación, todos los animales fueron inyectados con NaCl 0,9% (solución salina) (día 0, línea de base) y se midió la distancia recorrida total. Durante 5 días de condicionamiento, los animales fueron inyectados con solución vehículo-salino o cocaína (20 mg/kg). Se observó efecto del entrenamiento durante los 5 días de condicionamiento (ANOVA de medidas repetidas, efecto días:  $F_{(4,120)}=14.874$   $p<0.000$ ) en la distancia total recorrida. Hubo un efecto significativo del tratamiento en esta medida (ANOVA medidas repetidas:  $F_{(1,30)}=16.126$   $p<0,001$ ), pero no hubo diferencias significativas entre los genotipos (ANOVA medidas repetidas:  $F_{(1,30)}=0,000$ ,  $p<0,995$ ) y la interacción tratamiento x genotipo (ANOVA medidas repetidas:  $F_{(1,30)}=0,040$ ,  $p<0,844$ ). Se demostró que los animales tratados con cocaína recorrieron grandes distancias y exhibieron sensibilización en las sesiones de condicionamiento a cocaína (Figura 6A).

La interpretación de estos resultados requirió el examen de cada día de forma individual. En el día 1, no hubo diferencias entre genotipos ( $F_{(1,30)} = 0,476$ ,  $p<0,495$ ) y tratamiento ( $F_{(1,30)}=0,433$ ,  $p<0,5160$ ). En el día 2, no hubo diferencias entre genotipos ( $F_{(1,30)}=0,434$ ,  $p<0,515$ ) y el efecto del tratamiento no fue significativo ( $F_{(1,30)}=3,908$ ,  $p<0,057$ ). En los días 3-4, hubo diferencias estadísticamente significativas entre los

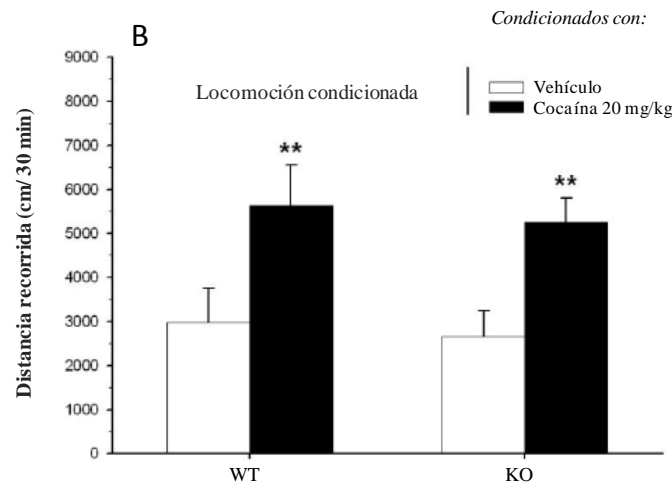
tratamientos (día 3:  $F_{(1,30)} = 8,468$ ,  $p < 0,007$ , día 4:  $F_{(1,30)} = 14,112$ ,  $p < 0,001$ ), pero no entre los genotipos (día 3:  $F_{(1,30)} = 0,0598$ ,  $p < 0,808$ , día 4:  $F_{(1,30)} = 0,0289$ ,  $p < 0,866$ ) (Figura 6A). Lo mismo ocurrió en último día, hubo diferencias significativas entre los tratamientos ( $F_{(1,30)} = 18,850$ ,  $p < 0,001$ ), pero no hubo diferencias significativa entre los genotipos ( $F_{(1,30)} = 0,0970$ ,  $p < 0,758$ ) (Figura 6A). Estos datos mostraron que las inyecciones de cocaína produjeron un aumento significativo en la actividad locomotora. El condicionamiento con cocaína (20 mg/kg) causó hiperlocomoción y sensibilización a partir del día 3 al 5, mostrando un efecto independiente del genotipo.



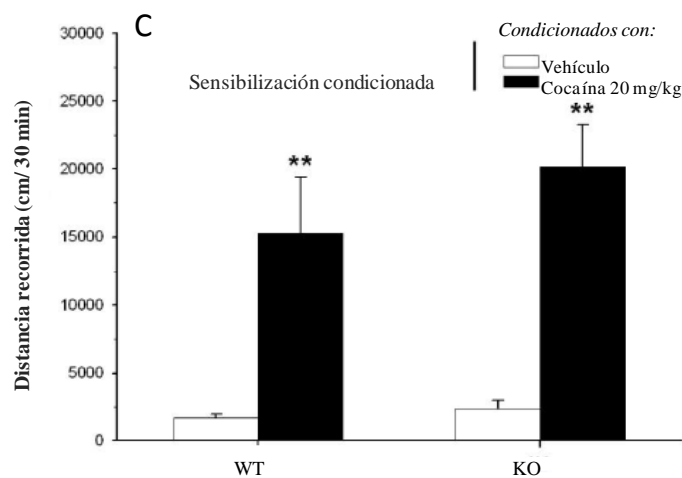
**Figura 6A.** Distancia total recorrida durante los 5 días de condicionamiento a cocaína \*\* $p < 0,001$  vs. control.

Para probar la expresión de LC y SC, después del período libre de drogas de 5 días, todos los animales fueron inyectados con vehículo y evaluados en campo abierto (día 11: LC). Al día siguiente, se dio a los animales pre-tratados con cocaína (20 mg/kg) una inyección de cocaína (10 mg/kg), (día 12: SC). En la prueba de LC, los datos mostraron efectos significativos del tratamiento (ANOVA de dos vías,  $F_{(1,31)} = 13,649$ ,  $p < 0,001$ ) (Figura 6B), pero no del genotipo (ANOVA de dos vías,  $F_{(1,31)} = 0,245$ ,  $p < 0,624$ ) al igual que tampoco en la interacción genotipo x tratamiento (ANOVA de dos vías,  $F_{(1,31)} = 0,002$ ,  $p < 0,964$ ) en la distancia total recorrida después de la retirada de la droga. En la prueba SC, hubo diferencias estadísticamente significativas en el efecto del tratamiento (ANOVA de dos vías,  $F_{(1,31)} = 33,832$ ,  $p < 0,001$ ) (Figura 5D), pero no del genotipo (ANOVA de dos vías,  $F_{(1,31)} = 1,101$ ,  $p < 0,302$ ) ni interacción genotipo x tratamiento (ANOVA de dos vías,  $F_{(1,31)} = 0,615$ ,  $p < 0,439$ ) después de la inyección de

cocaína (10 mg/kg). Los animales KO-PPAR $\alpha$  y WT mostraron un fuerte efecto en LC y SC inducida por cocaína, pero no se observaron diferencias entre ambos genotipos (Figura 6 B-C, respectivamente).



**Figura 6C.** Distancia total recorrida durante la LC en animales de ambos genotipos (WT y KO PPAR $\alpha$ )  
 \*\* $p < 0,001$  vs. control.

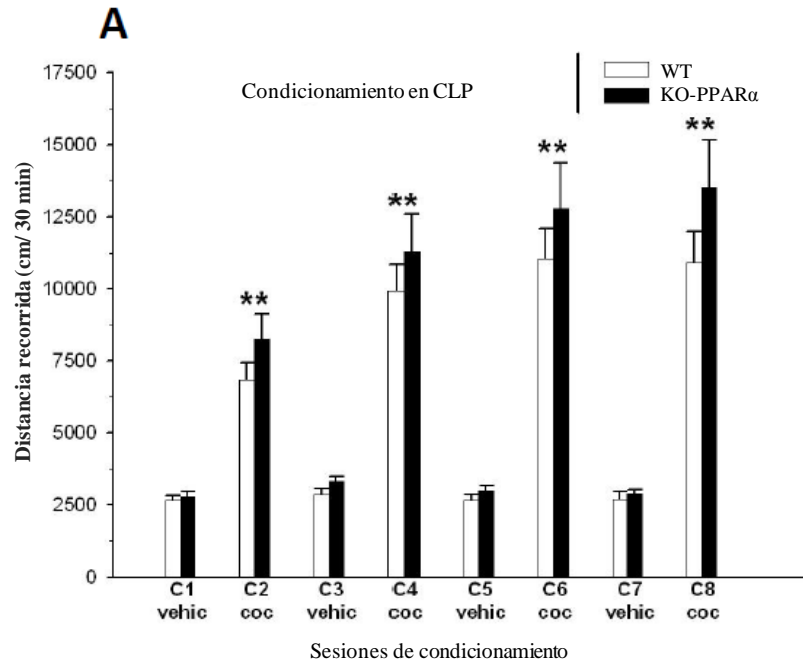


**Figura 6D.** Distancia total recorrida durante la SC en animales de ambos genotipos (WT y KO PPAR $\alpha$ )  
 \*\* $p < 0,001$  vs. control.

## 7. Efecto de la cocaína en expresión, extinción y restablecimiento de CLP en ratones KO-PPAR $\alpha$ .

Se utilizó el procedimiento de adquisición (pre-condicionamiento, condicionamiento y prueba de preferencia), extinción (parejas de extinción y la prueba de extinción) y el restablecimiento para evaluar el desarrollo del reforzamiento inducido por cocaína y la conducta de búsqueda de drogas. Todos los ratones fueron

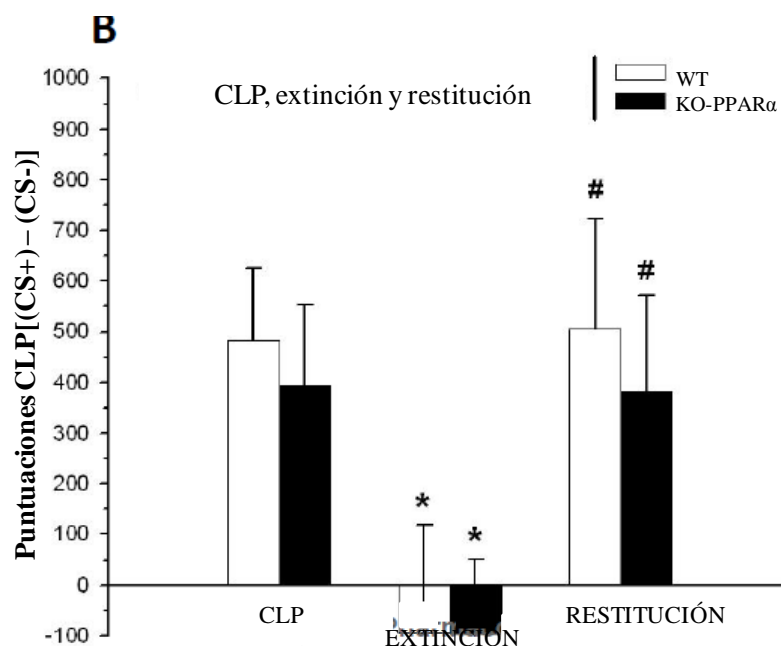
condicionados para discriminar un contexto bajo el efecto de cocaína, dando lugar a la preferencia en función del medio comparado con solución salina asociada al contexto (Figura 7A).



**Figura 7A.** Distancia total recorrida durante el proceso de condicionamiento en CLP, en los grupos administrados con cocaína y vehículo, en función del contexto. \*\* $p < 0,001$  vs. WT.

Las inyecciones repetidas de cocaína aumentaron la actividad, pero no se observaron cambios significativos entre los dos genotipos. Los animales KO-PPAR $\alpha$  y WT, mostraron un CLP significativo para el contexto asociado a la cocaína (ANOVA de medidas repetidas,  $F_{(2,46)}=7,005$ ,  $p < 0,002$ ) (Figura 6B), no obstante ni en el genotipo (ANOVA de medidas repetidas,  $F_{(1,23)}=0,003$ ,  $p < 0,957$ ), ni en el efecto de la interacción se observaron diferencias (ANOVA de medidas repetidas,  $F_{(2,46)}=0,013$ ,  $p < 0,987$ ). Todos los ratones pasaron más tiempo en el lado vinculado a la cocaína que en el compartimento asociado a la solución salina, mostrando un CLP significativo inducido por drogas, independientemente del genotipo.

En la prueba de extinción, KO-PPAR $\alpha$  y WT mostraron una reducción significativa del tiempo dedicado al compartimento de cocaína, después del entrenamiento de extinción (CLP vs. puntuación extinción,  $p < 0,001$ ) (Figura 7B) y, además, se obtuvo una puntuación similar en ambos genotipos. Un día después, una inyección de cocaína (10 mg/kg) produjo un restablecimiento más fuerte en comparación a la extinción (extinción vs. puntuación recaída, ( $p < 0,003$ ) (Figura 7B). Los animales KO-PPAR $\alpha$  y WT mostraron un re-establecimiento similar de respuesta CLP con una inyección de la mitad de la dosis de la cocaína inicial (20 mg/kg). Las inyecciones de cocaína resultaron altamente significativas en la preferencia de Lugar, pero de nuevo los dos genotipos no se diferenciaron en el recaída inducida por cocaína. En resumen, los animales KO-PPAR $\alpha$  mostraron puntuaciones CLP en la adquisición, la extinción y el restablecimiento que eran indistinguibles de la observada en los ratones de control WT.



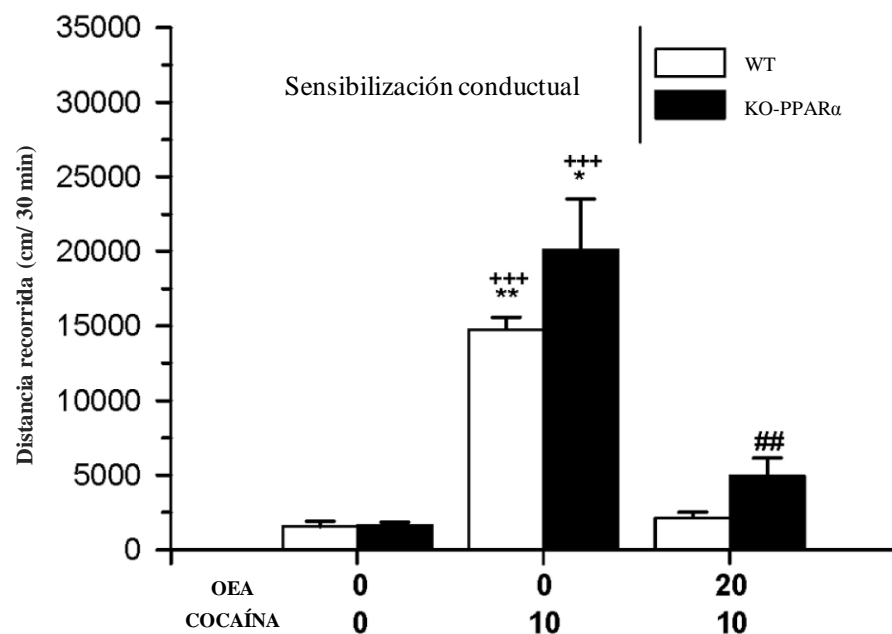
**Figura 7B.** CLP inducido por cocaína, extinción y restablecimiento en animales KO-PPAR $\alpha$  y controles WT \* $p < 0,001$  vs. control; # $p < 0,05$  vs. puntuaciones de extinción.

## 8. Efectos de la OEA sobre la LC y SC inducida por cocaína en ratones KO-PPAR $\alpha$ .

Después de 5 días de condicionamiento a cocaína y del período libre de drogas, todos los ratones fueron evaluados en la prueba de LC después de las inyecciones del vehículo.

Los datos muestran que hubo diferencias significativas en el efecto del tratamiento (ANOVA de dos vías,  $F_{(1,26)} = 56.256$ ,  $p < 0.001$ ) (Figura 8A), pero no del genotipo (ANOVA de dos vías,  $F_{(1,26)} = 1.184$ ,  $p < 0.287$ ) y sin diferencias en la interacción genotipo x tratamiento (ANOVA de dos vías,  $F_{(1,26)} = 0.689$ ,  $p < 0.414$ ).

Tras ello, se midió la expresión de SC con una inyección de cocaína (10 mg/kg) tras la administración aguda de OEA (20 mg/kg). Nuestros resultados mostraron que existió un efecto significativo del tratamiento con OEA (ANOVA de dos vías,  $F_{(1,20)} = 54.635$ ,  $p < 0.001$ ), y un ligero efecto del genotipo (ANOVA de dos vías,  $F_{(1,20)} = 4.702$ ,  $p < 0.042$ ), pero no de la interacción genotipo x tratamiento (ANOVA de dos vías,  $F_{(1,20)} = 0.452$ ,  $p < 0.509$ ). Estos resultados exponen que la administración de OEA puede bloquear el desarrollo de la sensibilización por cocaína, pero por una vía alternativa diferente a la del receptor  $PPAR\alpha$ .



**Figura 8A.** Distancia total recorrida durante SC (inyección de cocaína, 10 mg/kg). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$  vs. control.

## DISCUSIÓN ESTUDIO 2.

El presente estudio muestra claramente que la administración de OEA es capaz de atenuar las conductas inducidas por la cocaína, que incluyen la activación psicomotora, la adquisición de preferencia de lugar y la inducción de locomoción condicionada o sensibilización conductual. Estos efectos no son mediados por los receptores PPAR $\alpha$ , a pesar de su presencia en las neuronas dopaminérgicas. Por lo tanto, la supresión genética de este receptor nuclear no afecta a las acciones de comportamentales de la cocaína, ni afectó de forma clara a la eficacia farmacológica de la OEA. En general, los datos sugieren un papel de esta aciletanolamida en la regulación de la activación dopaminérgica por la cocaína, un hallazgo que podría ser relevante para la búsqueda de nuevas terapias en la adicción a la cocaína. El presente estudio también es compatible con los múltiples efectos fisiológicos descritos de la OEA, así como su claro perfil farmacológico distinto con respecto a los ligandos de los receptores PPAR $\alpha$ .

En el momento actual no hay ninguna indicación sobre los efectos de la cocaína en la producción de OEA o si el hallazgo farmacológico actual revela un verdadero papel de esta aciletanolamida en los procesos señalizadores de recompensa inducida por la cocaína. Sin embargo, se pueden descartar los receptores PPAR $\alpha$  como el principal objetivo de los efectos presentes, aunque este receptor medie en muchos de los efectos de la OEA, tales como la inhibición del apetito (Rodríguez de Fonseca, *et al.*, 2001; Fu, *et al.*, 2003; Lo Verme, *et al.*, 2005b).

Las acciones metabólicas (Fu, *et al.*, 2003; Guzmán, *et al.*, 2004), efectos anti-inflamatorios (Lo Verme, *et al.*, 2005b) o acciones en el aprendizaje (Campolongo, *et al.*, 2009; Mazzola, *et al.*, 2009) se han atribuido a su capacidad para estimular los receptores PPAR $\alpha$ , aumentando la información sobre las acciones de la OEA que no son mediadas a través de este receptor nuclear. Estos incluyen los efectos sobre la percepción del dolor visceral (Suardiaz, *et al.*, 2007), los flujos de calcio en las células  $\beta$  del páncreas (Ropero, *et al.*, 2009) o la motilidad gastrointestinal (Cluny, *et al.*, 2009). Por lo tanto, es importante separar el papel de los receptores PPAR $\alpha$  y sus agonistas en la regulación de las acciones de las drogas de abuso tales como la nicotina (Mascia, *et al.*, 2011) de los de la OEA. A pesar de las acciones de los agonistas de los receptores PPAR que no están estructuralmente relacionados con la OEA, como WY 14643, sobre las neuronas dopaminérgicas del ATV parecen estar especialmente mediados por los

---



receptores nicotínicos de la acetilcolina, no hay estudios que aborden las respuestas electrofisiológicas de la OEA sola o en combinación con drogas de abuso, y no existen estudios sobre la importancia de los receptores PPAR $\alpha$  para las acciones específicas de la OEA.

De este modo, los receptores PPAR $\alpha$  parecen ser relevantes para la adicción a nicotina tal como se revela en los estudios electrofisiológicos y de comportamiento (Miriam, *et al.*, 2010; Mascia, *et al.*, 2011). Esta clase de ligandos del receptor PPAR $\alpha$  parece no afectar a la autoadministración de cocaína en monos (Mascia, *et al.*, 2011), ni la supresión de los receptores PPAR $\alpha$  perjudica la sensibilización conductual inducida por cocaína en ratones KO para receptores PPAR $\alpha$  (Fernández-Espejo, *et al.*, 2009), lo que marca el papel de estos receptores nucleares en la adicción a la cocaína. Sin embargo, en ninguno de estos estudios ni OEA, ni análogos estructuralmente relacionados con OEA, tales como Meth-OEA se pusieron a prueba.

El hecho de que la OEA no sólo afecta a las acciones agudas de cocaína, sino también el aprendizaje implícito mediado por la cocaína como CLP y sensibilización, así como la locomoción condicionada, indica que el receptor PPAR $\alpha$  no es un objetivo de la OEA como sistema de señalización implicados en la plasticidad neuronal. Existirían varios objetivos a través del cual OEA podría inducir a tales cambios. Los efectos de la OEA sobre los receptores VR1 podría ser uno de esos objetivos (Almasi, *et al.*, 2008), así como las quinasas extracelulares reguladas que se activan por la OEA en varios tejidos (González-Yanes, *et al.*, 2005) y los principales reguladores de la plasticidad sináptica. En cualquier caso, las acciones de la OEA están en espera de un elemento de aprendizaje de recompensa, un hallazgo que abre nuevas vías para el tratamiento de la adicción. Aunque este hallazgo podría estar, en contraste con la función propuesta por OEA en la consolidación del aprendizaje (Campolongo, *et al.*, 2009), creemos que las diferencias entre paradigmas de aprendizaje y el uso de la cocaína como inductor de recompensa son suficientes para producir las aparentes diferencias. Otras dianas potenciales para la OEA, tales como los receptores GPR55 huérfano (Baker, *et al.*, 2006) y GPR119 (Overton, *et al.*, 2006) puede ser descartado sobre la base de nuestros conocimientos sobre la distribución de los receptores o la farmacología de la OEA en estos receptores.

---

En resumen, la OEA farmacológicamente hablando, puede atenuar las acciones comportamentales de la cocaína, lo que afecta no sólo a su efecto psicoestimulante agudo, sino también el aprendizaje de recompensa relacionados inducido por esta droga de abuso. La OEA no utiliza el receptor  $PPAR\alpha$  para dar respuestas a estas acciones. Se necesitan más investigaciones para la identificación de los objetivos de la OEA para esta acción inhibitoria sobre las respuestas mediadas por la cocaína.

---



## CONCLUSIONES ESTUDIO 2.

En este estudio, se analizaron las respuestas motivacionales y de locomoción de los animales, ante la administración de aciletanolamidas, no cannabinoideas y agonistas de PPAR $\alpha$ . Se evaluó el rol modulador que ejercían estas aciletanolamidas sobre las acciones manifestadas por agonistas indirectos dopaminérgicos, como la cocaína. Se evaluaron los efectos de las aciletanolamidas en animales WT y KO PPAR $\alpha$ . Se buscó evaluar las propiedades de refuerzo de cocaína a través de la inducción de sensibilización conductual y condicionamiento preferencial de lugar, en animales carentes del receptor activado por proliferadores de peroxisomas (PPAR $\alpha$ ) y el tratamiento con agonistas de PPAR $\alpha$ , Oleiletanolamida.

Al evaluar los efectos de la OEA y su co-administración con psicoestimulantes, como la cocaína, los resultados obtenidos tras la administración de OEA, se distribuyeron en función de 7 estudios, en los que se analizó la locomoción espontánea tras la administración de cocaína, el condicionamiento de lugar preferencial inducido por cocaína, OEA y locomoción condicionada y sensibilización conductual, en animales WT y KO PPAR $\alpha$ .

Midiendo los efectos de las dosis de OEA (5, 10 y 20 mg/kg), i.p., los datos mostraron que ninguna de las dosis de la OEA probadas, fueron capaces de inducir una respuesta condicionada de lugar preferencial o para el desarrollo de sensibilización conductual (SC). Los datos presentes también indican que una dosis no efectiva (en términos de actividad locomotora) de la OEA atenúa la respuesta en CLP inducida por cocaína (cuando se administra durante la fase de adquisición), pero no afecta en el desarrollo de sensibilización conductual o locomoción condicionada. Curiosamente, la disminución moderada de la locomoción, con dosis de OEA 5 mg/kg, fue capaz de atenuar la respuesta de CLP inducida por cocaína, aunque bloquea la respuesta del aparato locomotor, inducida por la cocaína. Sin embargo, este efecto desapareció después de 4 inyecciones de cocaína con OEA. La dosis de OEA, 20 mg/kg fue capaz de bloquear por completo las respuestas de CLP inducidas por cocaína, el desarrollo de la sensibilización conductual y la respuesta de locomoción condicionada.

Nuestros resultados mostraron que la administración aguda de OEA dio lugar a una atenuación dosis- dependiente de la locomoción espontánea y la sensibilización conductual, inducida por cocaína. Sin embargo, la administración de OEA no afectó a la

---

adquisición de sensibilización inducida por la cocaína o en la expresión de preferencia de lugar condicionada.

En conclusión, nuestros resultados indican que el sistema OEA-PPAR $\alpha$  puede ejercer funciones de modulación de las respuestas conductuales inducidas por la cocaína. Nuestros resultados indican que la OEA es capaz de atenuar las conductas inducidas por la cocaína, un hallazgo de relevancia para el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de la adicción a la cocaína. Estos efectos parecen ser independientes de los receptores PPAR $\alpha$ , ya que la eliminación genética de gen del receptor PPAR $\alpha$  no afectó a las conductas inducidas por cocaína, ni eliminando totalmente las acciones de la OEA.

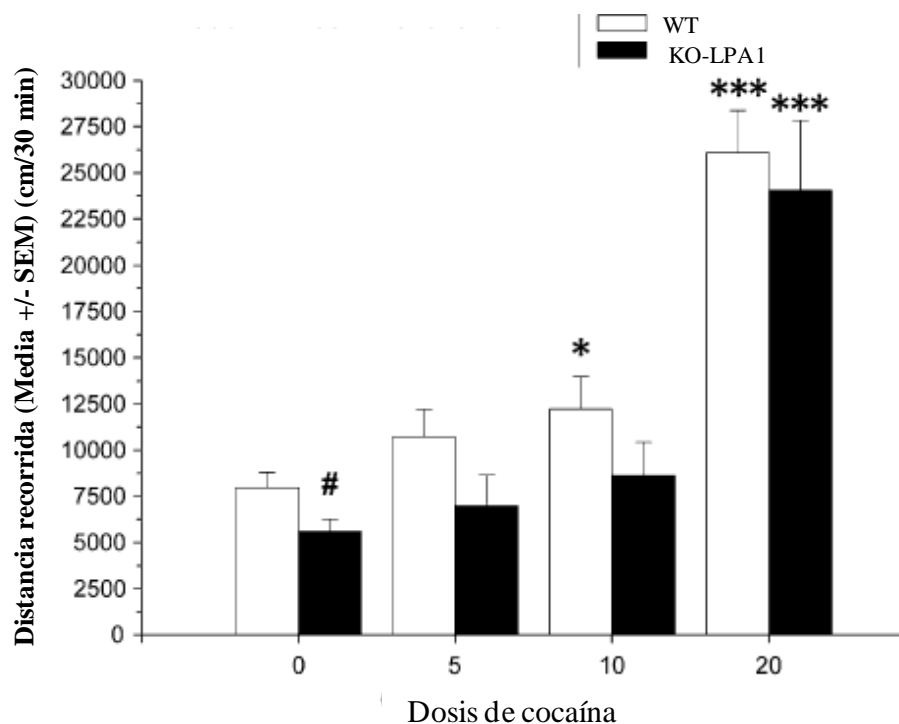
Este estudio completa las descripciones anteriores sobre la interacción entre los mecanismos neurobiológicos implicados en el desarrollo de la adicción a la cocaína y el sistema de receptores PPAR $\alpha$ -OEA.

---

**ESTUDIO 3. Estudio de la atenuación de la locomoción condicionada inducida por cocaína en la expresión de receptores de glutamato del hipocampo en ratones carentes del receptor  $LPA_1$ .**

**1. Efecto de la administración de cocaína en ratones KO-maLPA<sub>1</sub>.**

Se llevó a cabo una curva dosis-respuesta de cocaína en campo abierto durante 30 minutos con ratones *wild-type* y KO-maLPA<sub>1</sub> (Figura 1). La cocaína activa la locomoción diferencial en los dos genotipos (efecto del tratamiento ( $F_{(3,69)} = 48.128$ ,  $p < 0.001$ ) y efecto del genotipo ( $F_{(1,69)} = 5.976$ ,  $p < 0.01$ ] ANOVA de dos vías). En ambos genotipos, la dosis de 20 mg/kg produjo efectos similares, aunque los animales KO-maLPA<sub>1</sub> tenían una menor actividad en comparación con el *wild-type* tras una inyección de vehículo ( $p < 0.05$ ) (Figura 1).

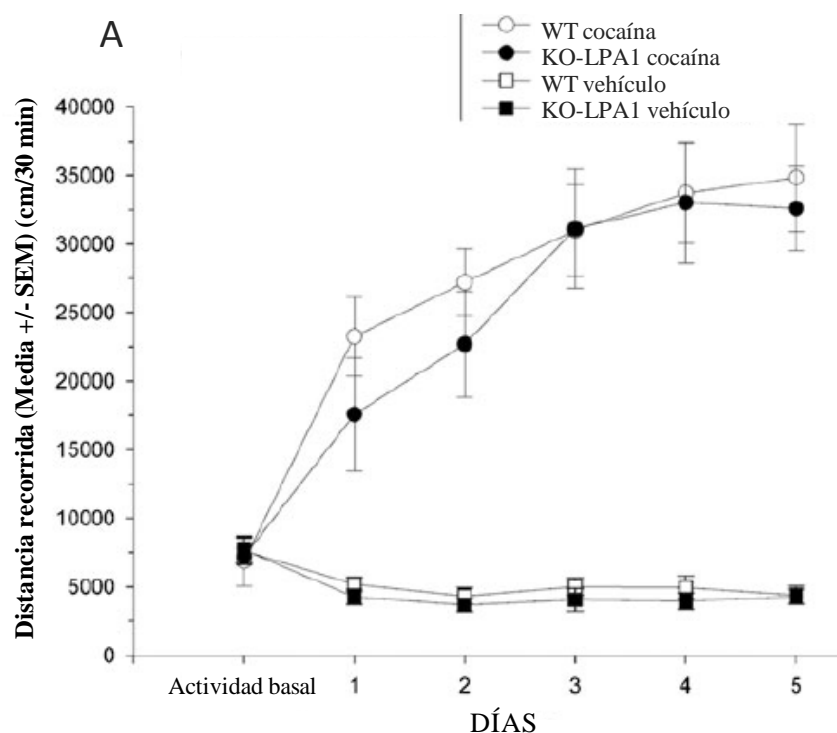


**Figura 1.** Aumento de la locomoción inducida por cocaína. Los datos representan la distancia media recorrida después de tres dosis de cocaína por cualquiera de los ratones *wild-type* y KO-maLPA<sub>1</sub>. Las barras de error indican SEM. \*\*\* $p < 0.001$ ; \* $p < 0.05$  (frente a un tratamiento control de cocaína); # $p < 0.05$  ratones KO-maLPA<sub>1</sub> vs *wild-type*.

## 2. Condicionamiento con cocaína en ratones KO-maLPA<sub>1</sub>.

La figura 2 muestra los resultados en la adquisición de sensibilización (Figura 2A), LC (Figura 2B) y de la SC (Figura 2C) (apartado 3: *LC a cocaína y SC inducida por cocaína en ratones KO-maLPA<sub>1</sub>*). Sobre la base estudios de dosis-respuesta en cocaína, se seleccionaron las dosis de 20 mg/kg para el condicionamiento durante cinco días consecutivos.

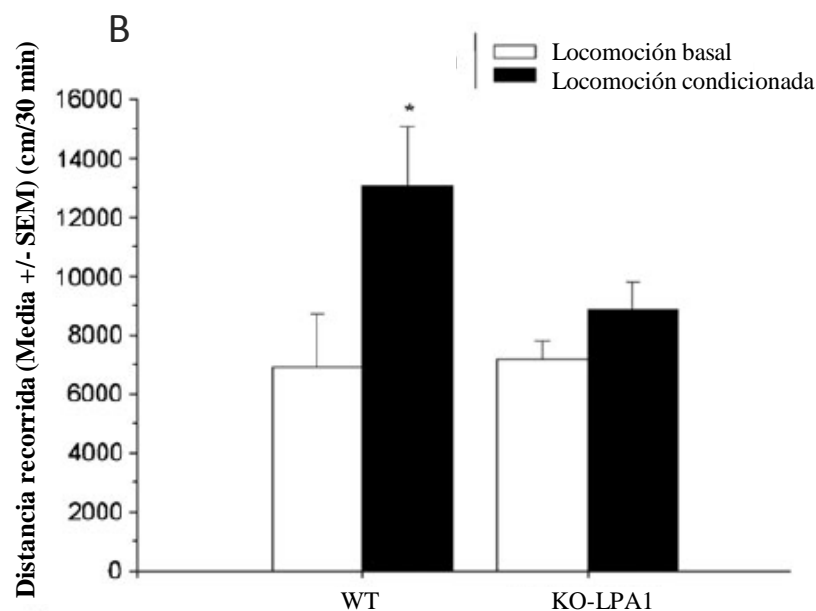
Ambos genotipos tuvieron una adquisición similar de condicionamiento de cocaína a lo largo de las cinco inyecciones consecutivas (Figura 2A) (ANOVA de medidas repetidas: efecto días,  $F_{(4,164)} = 11.113$ ,  $p < 0,001$ ) para la distancia total recorrida, (ANOVA de medidas repetidas: efecto días x tratamiento,  $F_{(4,164)} = 11.436$ ,  $p < 0,001$ ) por efecto del tratamiento). No se observó diferencia significativa entre los genotipos (ANOVA de medidas repetidas: efecto del genotipo,  $F_{(1,41)} = 2,903$ ,  $p = 0,096$ ), ni el tratamiento  $\times$  interacción genotipo (ANOVA de medidas repetidas: efecto de la interacción,  $F_{(1,41)} = 1,442$ ,  $p = 0,237$ ).



**Figura 2A.** El tratamiento crónico con cocaína (20 mg/kg) mejora de forma significativa la actividad locomotora en campo abierto durante 5 días de entrenamiento con independencia del genotipo en comparación con los grupos vehículos.

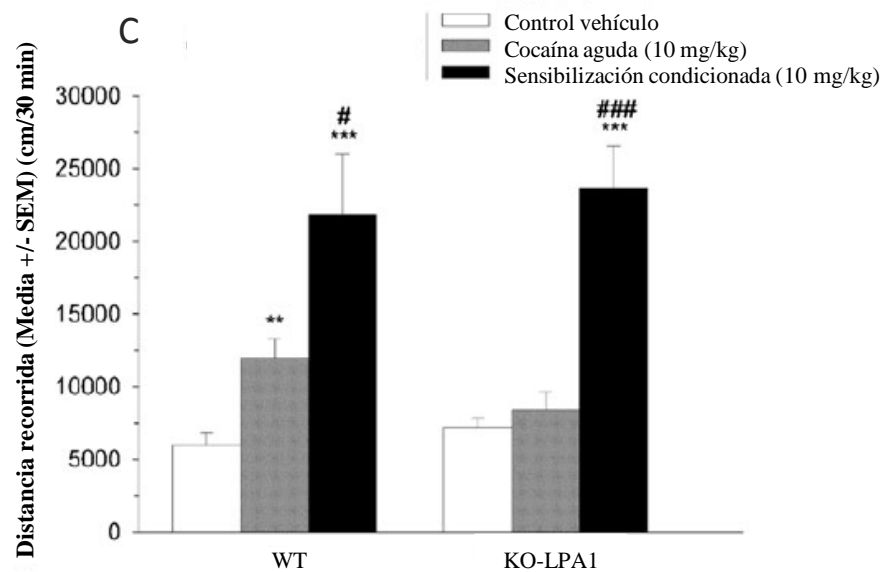
### 3. LC a cocaína y SC inducida por cocaína en ratones KO-maLPA<sub>1</sub>.

Inyecciones repetidas de cocaína indujo LC (ANOVA de dos vías, efecto del tratamiento,  $F_{(1,32)} = 7,822$ ,  $p < 0,05$ ). El grupo *wild-type* pre-tratados con cocaína crónica mostraron una respuesta condicionada locomotora en relación con el grupo no condicionado ( $p < 0,05$ ) (Figura 2B). Sin embargo, los animales KO-maLPA<sub>1</sub> condicionados a cocaína mostraron una atenuación de la LC. Estos datos sugieren que el deterioro de una respuesta en LC en animales KO-maLPA<sub>1</sub> tiene un déficit de memoria en la expresión del condicionamiento contextual. Al día siguiente, se evaluó la SC con los mismos grupos de animales utilizados en la LC, pero en este caso, cada grupo pre-tratado con cocaína crónica fueron inyectados con cocaína a mitad de la dosis (10 mg/kg) y cada grupo de locomoción basal fue inyectado con vehículo (control del vehículo) o cocaína aguda (10 mg/kg). Se encontró que la locomoción se ve aumentada con la administración de cocaína (ANOVA de dos vías, efecto del tratamiento,  $F_{(2,51)} = 28.608$ ,  $p < 0,001$ ), con una respuesta similar en ambos genotipos (ANOVA de dos vías,  $F_{(1,51)} = 0,870$ ,  $p = 0,425$ ) y ningún efecto interacción tratamiento  $\times$  genotipo (ANOVA de dos vías, efecto de la interacción,  $F_{(2,51)} = 0,870$ ,  $p = 0,425$ ). Por lo tanto, tras un *priming* de cocaína, los ratones KO-maLPA<sub>1</sub> y WT mostraron una sólida SC (Figura 2C).



**Figura 2B.** Locomoción condicionada observada en el grupo de animales *wild-type* expuestos a cocaína, pero no en animales KO-maLPA<sub>1</sub>. \*  $p < 0,05$  vs. locomoción basal.



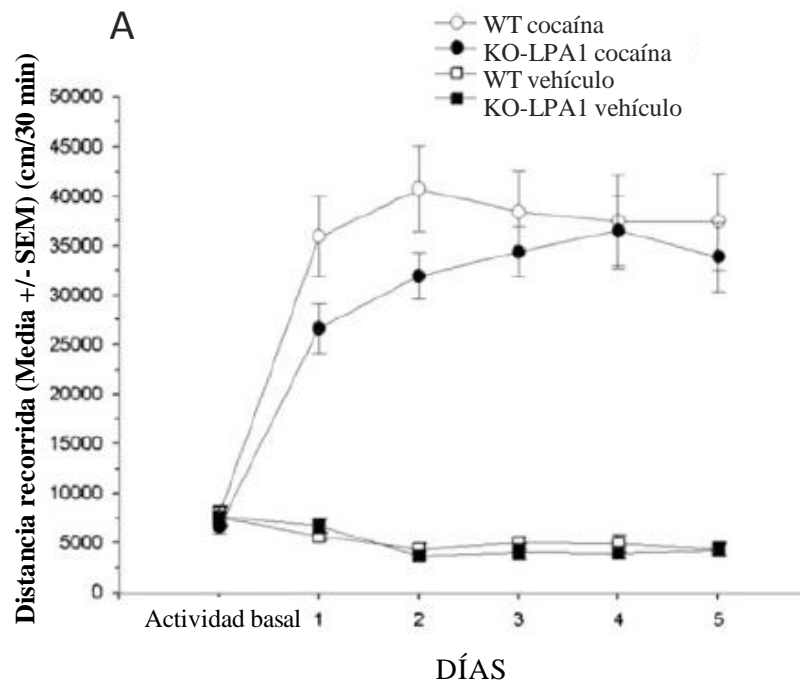


**Figura 2C.** Un *priming* de cocaína (10 mg/kg) provocó el restablecimiento robusto de la respuesta de locomoción en los dos genotipos que muestran la sensibilización conductual. Los datos representan la distancia media recorrida  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0,001$  y \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  en comparación con el control del vehículo, # $p < 0,05$  y ### $p < 0,001$  en comparación con aguda de cocaína (10 mg/kg).

#### 4. Locomoción condicionada y sensibilización conductual inducida por cocaína en animales KO-maLPA<sub>1</sub> evaluados de forma independiente.

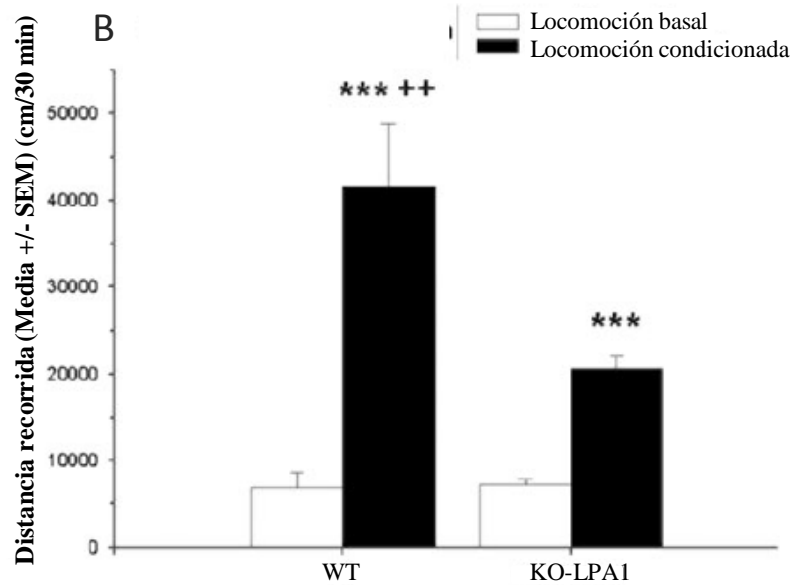
A fin de verificar que la exposición previa a la prueba en el estudio de LC no es la inducción de una recuperación de la sensibilización conductual en ratones KO-maLPA<sub>1</sub>, se probó de nuevo la LC y SC a diferentes grupos de animales. Además, los ratones fueron evaluados durante un período más largo de tiempo (90 minutos) y las sesiones de prueba se analizaron por intervalos de tiempo (10 minutos).

En la prueba de LC, el análisis de los efectos principales mostró un efecto significativo del tratamiento (ANOVA de dos factores: efecto del tratamiento,  $F_{(1,25)} = 97.783$ ,  $p < 0,001$ ), el genotipo (ANOVA de dos vías: efecto del genotipo,  $F_{(1,25)} = 18.012$ ,  $p < 0,001$ ) y la interacción (ANOVA de dos factores: efecto de la interacción,  $F_{(1,25)} = 19.177$ ,  $p < 0,001$ ). El grupo de animales *wild-type* pre-tratados de forma crónica con cocaína mostraron una respuesta normal de locomoción condicionada en relación con el grupo de control no condicionado ( $p < 0,001$ ), que permaneció durante toda la prueba 90 minutos (figura 3A).

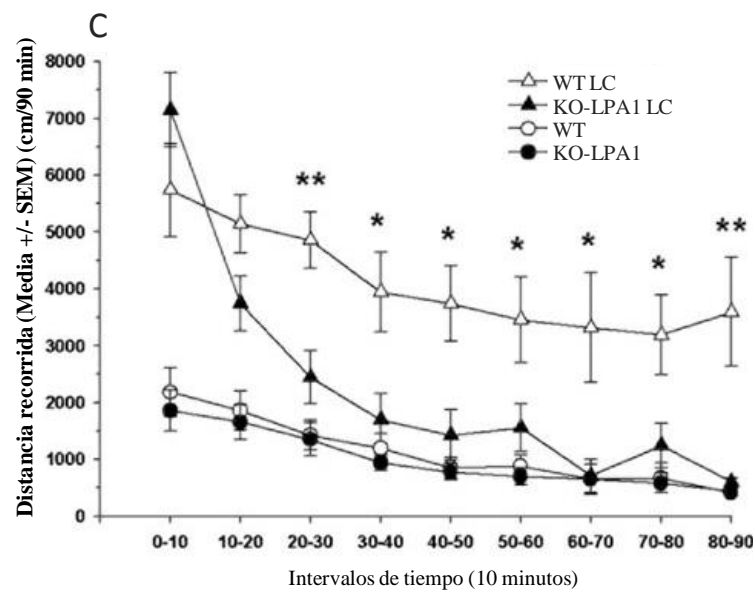


**Figura 3A.** Tratamiento crónico con cocaína (20 mg/kg). Actividad locomotora significativamente aumentada, en campo abierto durante 5 días de entrenamiento, independientemente del genotipo en comparación con grupos control.

Sin embargo, a pesar de que los animales KO-maLPA<sub>1</sub> también mostraron locomoción condicionada (figura 3B), se limitó a los intervalos de tiempo inicial (20 minutos) desapareciendo después (figura 3C). A partir del minuto 20 al 90 tras la exposición al campo abierto, los animales KO-maLPA<sub>1</sub> tuvieron un comportamiento similar al de los animales no condicionados.



**Figura 3B.** los ratones de WT y KO-maLPA<sub>1</sub>, pre-tratados con cocaína mostraron respuesta de locomoción condicionada en comparación con grupos control, pero esta respuesta fue significativamente menor en animales KO-maLPA<sub>1</sub> en comparación con ratones WT. \*\*\* $p < 0,001$  en comparación con grupos control y ++ $p < 0,01$  en comparación con el grupo WT condicionado.

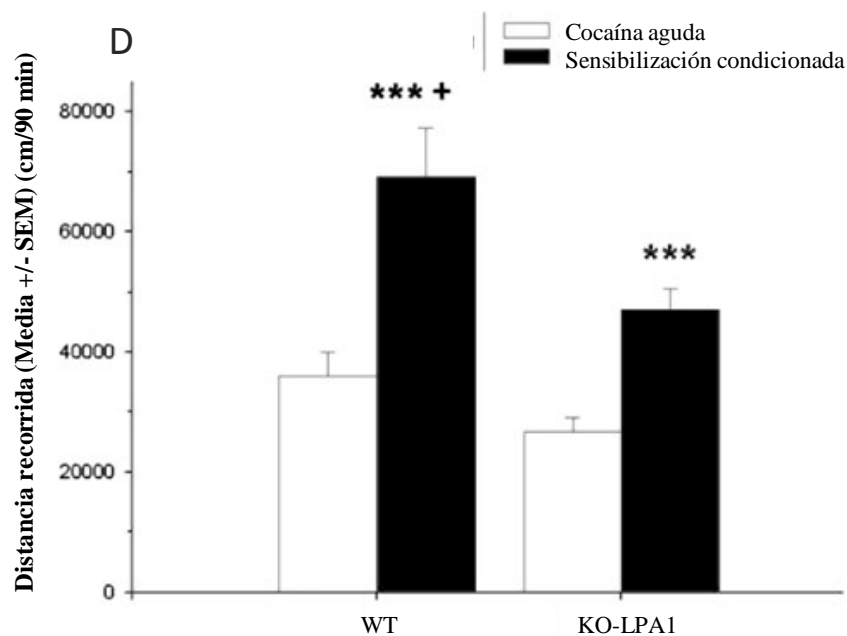


**Figura 3C.** Sesión de LC en intervalos de tiempo (10 minutos), el análisis mostró un déficit de LC en KO-maLPA<sub>1</sub> (20-90 minutos). \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  en comparación con el grupo KO-maLPA<sub>1</sub> condicionado.

Mientras que el aumento de locomoción de los animales condicionados con cocaína sobre los condicionados con vehículo (solución salina) fue de 83,4%, la presentada por los animales KO-maLPA<sub>1</sub> fue de 65%. Por otra parte, las puntuaciones totales de LC en ratones WT fue 50,4% mayor que el de los animales KO-maLPA<sub>1</sub>. La atenuación de esta respuesta está de acuerdo con el experimento anterior, aunque la LC inicial observada no estaba presente en el primer día de experimentación. La

variabilidad en la respuesta a la novedad y condicionamiento en ratones KO-maLPA<sub>1</sub> se ha observado antes, creyéndose que está relacionado con una alteración de los procesos emocionales observados en estos animales (Castilla-Ortega, *et al.*, 2010).

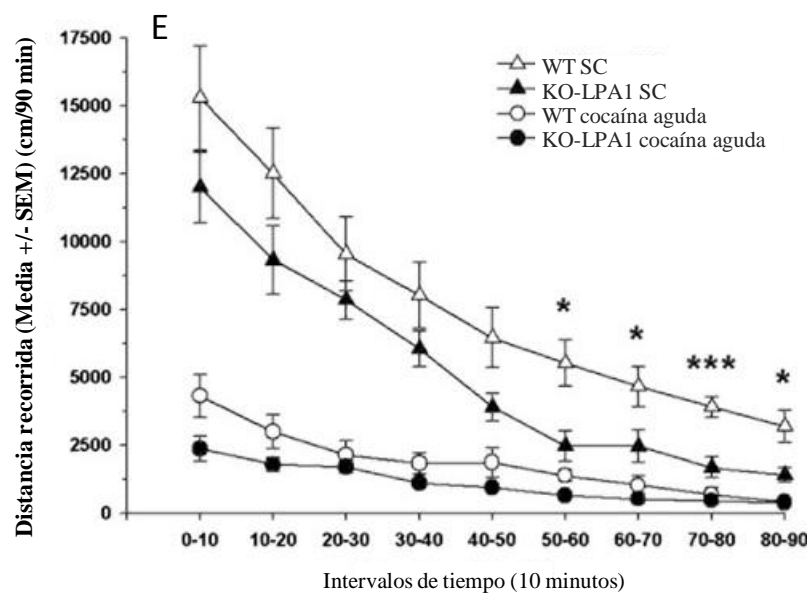
En un grupo separado de animales, se midió la respuesta de SC después de un *priming* de cocaína (10 mg/kg) y sus correspondientes controles agudos de cocaína (10 mg/kg). Los resultados revelaron que los grupos que habían sido sensibilizados con cocaína mostraron un aumento de la actividad locomotora en comparación con aquellos que habían recibido una dosis de cocaína por primera vez (ANOVA de dos factores: efecto del tratamiento,  $F_{(1,44)} = 33.400$ ,  $p < 0,001$ , figura 3D), independientemente del genotipo (ANOVA de dos factores: efecto del genotipo,  $F_{(1,44)} = 11.392$ ,  $p = 0,01$ ) y la interacción (ANOVA de dos factores: efecto de la interacción,  $F_{(1,44)} = 1,865$ ,  $p = 0,179$ ). La administración de un *priming* de cocaína indujo sensibilización conductual en comparación con los controles administrados con cocaína aguda ( $p < 0,001$ ) en los dos genotipos, pero la respuesta de este fue menor en los animales KO-maLPA<sub>1</sub> ( $p < 0,01$ ) (figura 3D).



**Figura 3D.** La inyección de un *priming* de cocaína (10 mg/kg) produjo una intensa SC en los dos genotipos que muestran SC. \*\*\* $p < 0,001$  vs. grupo con cocaína aguda (10 mg/kg) y + $p < 0,05$  en comparación con animales KO-maLPA<sub>1</sub> sensibilizados con cocaína.

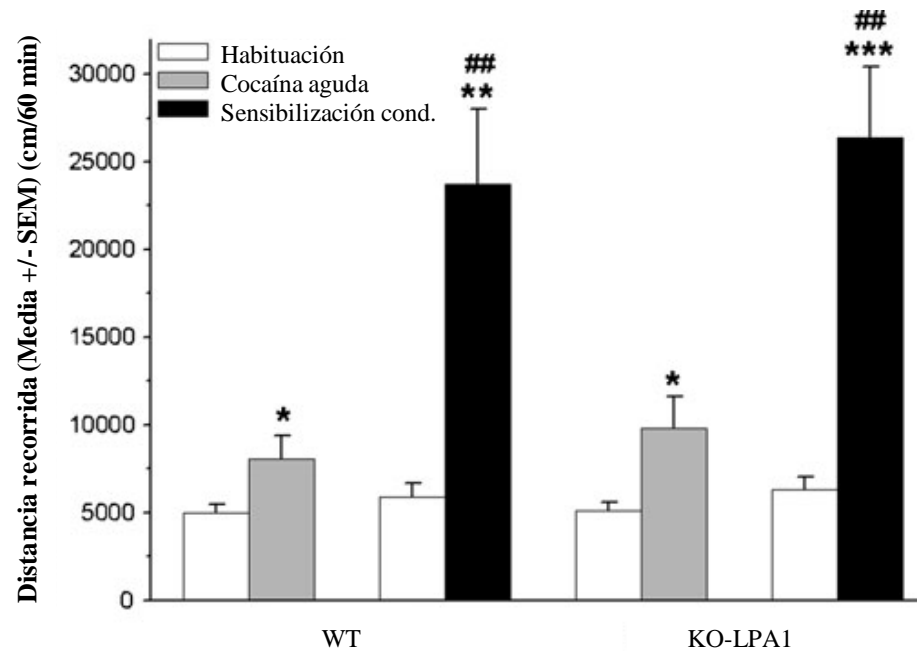
Esta fuerte sensibilización inducida por cocaína se observó de igual forma entre espacios de tiempo de 0 a 50 minutos, cuando el efecto de la sensibilización es asimismo, más fuerte en los dos genotipos (figura 3E). En los últimos minutos de la

sesión de SC (50-90 minutos), se encontró diferencias significativas en la actividad locomotora en ratones *wild-type* y KO-maLPA<sub>1</sub> ( $p<0,05$ ,  $p<0,001$ ), pero estas diferencias podrían deberse a una efecto residual de la memoria contextual asociativa, más que como resultado de la sensibilización inducida por cocaína por sí misma. Las puntuaciones globales de SC se situaron por encima de los grupos de cocaína aguda aumentaron de manera similar en ambos genotipos (47,9% para los *wild-type* y el 43,4% de maLPA<sub>1</sub>).



**Figura 3E.** Sesión de SC en intervalos de tiempo (10 min), el análisis no mostró diferencias en la sensibilización entre los genotipos, excepto en los últimos minutos de la sesión (50-90 minutos). La significación estadística se indica mediante \* $p<0,05$  y \*\*\* $p<0,001$  en comparación con los animales maLPA<sub>1</sub> sensibilizados. Las barras de error indican SEM.

Por último, se analizó si la habituación al campo abierto pudo afectar a la expresión de SC. Con este fin, los animales condicionados con solución salina o con cocaína (20 mg/kg) fueron inyectados con solución salina y se habituaron al campo abierto durante 60 minutos. Luego, se les inyectó cocaína (10 mg/kg). Los resultados se muestran en la figura 4. En campo abierto, los animales de los dos genotipos habituados, mostraron una respuesta clara a la cocaína ( $F_{(3,63)}= 33.641$ ,  $p<0,001$ ), que fue claramente diferente entre los grupos condicionados con solución salina con respecto a los condicionados con cocaína, que exhibió una marcada sensibilización inducida por cocaína. No hubo diferencias entre genotipos ( $F_{(1,63)}= 0,583$ ,  $p=0,448$ ) ni interacciones genotipo  $\times$  cocaína en la prueba de SC ( $F_{(3,63)}= 0,141$ ,  $p=0,935$ ).

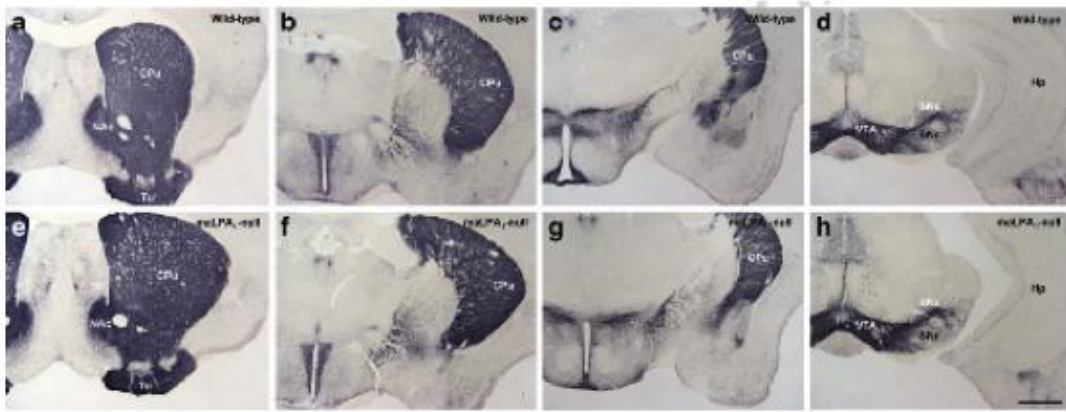


**Figura 4.** La falta de efectos de una habituación previa a campo abierto (60 minutos de exposición) en cocaína aguda (10 mg/kg) induce sensibilización del comportamiento medido tanto en ratones *wild-type* y KO-maLPA<sub>1</sub> tras inyección durante 5 días con solución salina o cocaína 20 mg/kg. Ambos genotipos mostraron un aumento similar de la locomoción por la administración de cocaína con respecto a esa medida a lo largo de 60 minutos de habituación (columnas abiertas). Este efecto psicoestimulante fue mayor en los animales que fueron inyectados con anterioridad, durante 5 días con cocaína (columnas de negro, animales sensibilizados) que en aquellos que recibieron 5 días de solución salina (columnas grises). La significación estadística se indica mediante \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  y \*\*\* $p<0,001$  cocaína vs. locomoción habituado. Ambos genotipos presentaron respuestas sensibilizados \*\* $p<0,01$  y \*\*\* $p<0,001$  administración repetida de cocaína repetida vs. control. Las barras de error indican SEM.

## 5. Resultados inmunohistoquímicos.

Con el fin de obtener conocimientos sobre los posibles mecanismos implicados en los efectos de la eliminación de los receptores LPA1 en LC, se exploró la integridad de la transmisión dopaminérgica en el estriado y la expresión de los receptores glutamatérgicos en el hipocampo dorsal.

Con el fin de obtener más información sobre la distribución anatómica de TH y la expresión de la proteína para TH y DAT, se realizó un análisis inmunohistoquímico. La figura 5 muestra que la distribución de TH tiene un patrón similar en ambos genotipos y que el tratamiento crónico con cocaína reduce TH por igual en ambos genotipos. Esto es consistente con la respuesta normal del comportamiento en términos de sensibilización después de la exposición crónica.



**Figura 5.** Células TH-positivas en las diferentes secciones de cerebro de mediante inmunohistoquímica de TH en ratones de *wild-type* y *maLPA1*-nulos. La expresión de inmunoreactividad de TH no mostraron diferencias cualitativas entre ambos genotipos en caudado putamen (CPU), el núcleo acumbens (Nac), sustancia negra, hipocampo (Hp), y bulbo olfatorio. Las distancias aproximadas de bregma son de nivel A 0.62 mm, nivel B -5.8 mm, nivel C -1.58 mm y el nivel D -3.40 mm. Barra de escala GluR3  $F_{[1,12]} = 5.88$ ,  $p < 0.05$   $F_{[1,12]} = 5.19$ ,  $p < 0.05$   $F_{[1,12]} = 3.15$ ,  $p = 0.101$  efecto genotipo efecto cocaína  $t_{7.8} = 100$  micras.

### DISCUSIÓN ESTUDIO 3.

El presente estudio tuvo como objetivo estudiar si la eliminación selectiva de LPA<sub>1</sub> está involucrado en la locomoción condicionada y sensibilización inducida por cocaína. Estas dos modalidades de aprendizaje implican diferentes circuitos de interacción córtico-límbico-estriado. Nuestros resultados sugieren que la señalización mediada por LPA<sub>1</sub> es relevante para la expresión de LC contextual inducida por cocaína, pero no SC después de repetidas exposiciones. El deterioro de la respuesta mostrada por LC en animales KO-maLPA<sub>1</sub> podría indicar una alteración en aprender correctamente la relación entre las propiedades de un entorno (campo abierto) y las propiedades recompensantes de la cocaína o la incapacidad de mantener la expresión de la respuesta condicionada por la interferencias emocionales, dadas las alteraciones que los KO-maLPA<sub>1</sub> exhiben en el procesamiento emocional (Castilla-Ortega, *et al.* 2010).

En este trabajo, se demostró que el déficit de memoria en la expresión de LC a cocaína puede estar asociada a alteraciones en los receptores glutamatérgicos en el hipocampo dorsal, en ausencia de LPA<sub>1</sub>. Por el contrario, los animales KO-maLPA<sub>1</sub> desarrollaron una sólida adquisición de condicionamiento a cocaína y de la respuesta de SC después de un *priming* de cocaína (10 mg/kg), sin diferencias con respecto a los ratones control *wild-type*. Esta disociación entre la señal inducida por el comportamiento de búsqueda de recompensa y conductas directamente produciendo recompensa contingente refleja la participación de los diferentes circuitos neuronales funcionales (Grimm y Sede, 2000; Vorel, *et al.*, 2001). Por otra parte, estudios recientes han confirmado claramente esta hipótesis, mostrando como la LC y SC puede estar disociada en ratones (Hotsenpiller y Wolf, 2002; Tirelli, *et al.*, 2003).

El sistema dopaminérgico mesocorticolímbico juega una función importante en la SC inducida por cocaína (Pierce y Kalivas, 1997). En este estudio, no se encontraron cambios selectivos en la SC en animales KO-maLPA<sub>1</sub>, ni en las medidas bioquímicas subyacentes. Las pruebas de inmunorreactividad sobre TH en el estriado, NAC, sustancia negra, y el hipocampo fueron normales en ambos genotipos estudiados. Por otra parte, la disminución en el contenido de TH en el estriado dorsal inducido por cocaína fue igual en ambos genotipos.

En nuestro estudio, parece que el sistema dopaminérgico estriatal no se ve afectado ni por la falta del receptor LPA<sub>1</sub> ni la tarea de LC, aunque mostró algunos

---



cambios en la proteína TH. Esto indica que tanto la respuesta normal del SC a la cocaína y los mecanismos moleculares subyacentes se mantienen en ratones KO-maLPA<sub>1</sub>. El hipocampo dorsal juega un papel esencial en el recuerdo del contexto de la recompensa inducida por cocaína (Meyers, *et al.*, 2003). En concreto, el giro dentado del hipocampo parece esencial para generar y expresar los recuerdos del contexto de miedo y los efectos reforzantes de la cocaína en la prueba de lugar de preferencia condicionada (CLP) (Hernández-Rabaza, *et al.*, 2008), así como participa en la locomoción condicionada y de sensibilización conductual (Pierce y Kalivas 1997; Mohn, *et al.*, 2004; Borrero Rodríguez, *et al.*, 2006; Chambers, *et al.*, 2010).

Los resultados de comportamiento de este trabajo son consistentes con trabajos anteriores que demostraron un papel esencial del hipocampo en el restablecimiento de auto-administración por señales contextuales (Fuchs, *et al.*, 2005) y por la prueba de CLP (Meyers, *et al.*, 2006). Hoy en día, sabemos que la señalización glutamatérgica en el circuito de recompensa del cerebro ejerce un poderoso control sobre la búsqueda de drogas. La re-exposición a un ambiente vinculado previamente a los efectos reforzantes de la cocaína produjo una mejora en los niveles de fosforilación GluR1 (Ser845 fosfo-GluR1) a niveles del hipocampo dorsal evaluados a partir de la prueba de condicionamiento de lugar preferencial (Tropea, *et al.*, 2008). No se observó aumento tal, sino una tendencia a una disminución de la fosforilación GluR1 en el hipocampo dorsal, como resultado de la exposición al medio ambiente de cocaína. Sin embargo, sí encontramos cambios genotípicos específicos en los receptores de glutamato. Ellos se limitaban al receptor metabotrópico mGLUR3 y la subunidad GLUR3 del receptor AMPA.

En cuanto a los receptores AMPA, nuestros resultados indican que la subunidad GLUR3 es diferencialmente regulada por la cocaína en el hipocampo de los ratones KO-maLPA<sub>1</sub> con respecto a los ratones control, lo que indica que el receptor AMPA puede estar relacionado con el receptor LPA<sub>1</sub> dependiente de las diferencias en el genotipo LC observados en el presente estudio. Sin embargo, la naturaleza de las alteraciones encontradas difiere de la encontrada en estudios previos. En el NAc, la superficie de las células del receptor AMPA (GluR1) aumentó después de la abstinencia de cocaína, pero es interiorizado después del *priming* de cocaína. Esta internalización se acompaña de alteraciones en la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (Boudreau, *et al.*, 2007; Kourrich, *et al.*, 2007). Sin embargo, aunque se

---

encontró que los niveles de ARNm de GluR1 y GLUR3 disminuyó después del pre-tratamiento crónico con cocaína, los estudios revelaron que hubo una mayor asociación entre GluR1 y subunidades de GluR3 en ratones sensibilizados a cocaína, lo que sugiere una modulación de la sensibilización con especial atención a las subunidades AMPA (Boudreau, *et al.*, 2007). Así, a partir de *immunoblotting* se observó que la mayoría de receptores AMPA en el Nac de los animales son GluR1/2 o GluR2/3, mientras que <10% son homoméricos, GluR1 o GluR1 / 3, y esto es al revés por el tratamiento de cocaína lleva a SC.

Las diferencias con los resultados actuales pueden estar basadas en las diferentes especies (rata) y el área diferente del cerebro (núcleo accumbens) que es utilizado en el diseño experimental. Se necesitan más estudios para entender el papel de estos receptores AMPA en la sensibilización de cocaína y de la locomoción condicionada en animales KO-maLPA<sub>1</sub>. En cualquier caso, hay proyecciones glutamatérgicas del hipocampo al Nac, que regulan la transmisión DA en esta estructura. En concreto, neuronas glutamatérgicas del hipocampo ventral proyectan a la región del Nac, mientras que el hipocampo dorsal envía proyecciones glutamatérgicas a la región central de Nac.

Si los cambios en la expresión de GLUR3 observada en el hipocampo de los ratones sensibilizados KO-maLPA<sub>1</sub> son la base de la falta de LC a través de la regulación de la fisiología de Nac que queda por determinar.

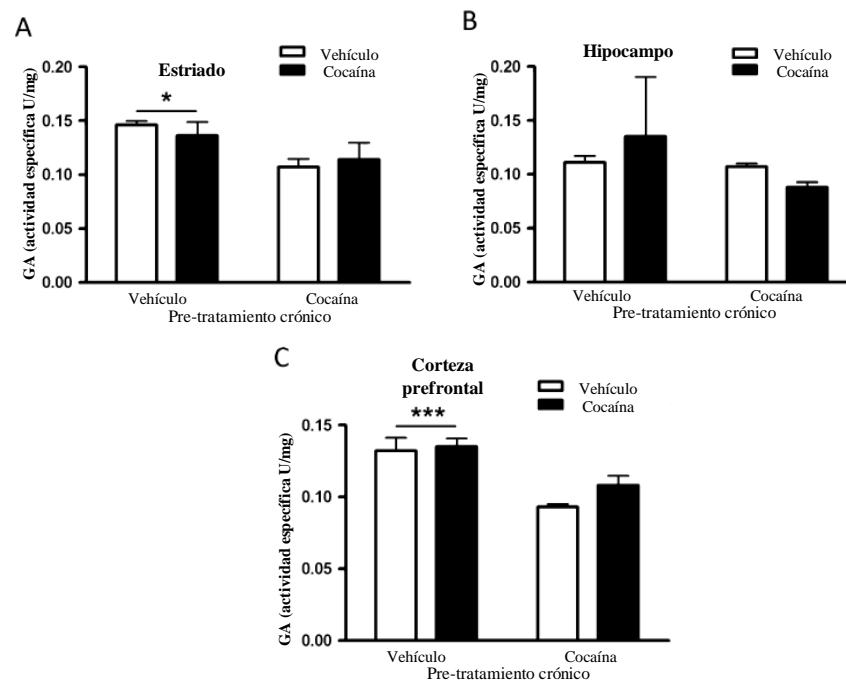
En conclusión, el deterioro de la LC inducida por cocaína en los animales por KO-maLPA<sub>1</sub> no pueden ser explicados por alteraciones de la expresión de genes relacionados con la transmisión dopaminérgica en el sistema estriatal. Sin embargo, las alteraciones de los receptores metabotrópicos glutamatérgicos, mGluR3, en animales KO-maLPA<sub>1</sub> y los receptores AMPA (GLUR3) después del pre-tratamiento crónico con cocaína en el hipocampo dorsal podría explicar estas alteraciones. Por lo tanto, proponemos que receptores LPA<sub>1</sub> pueden actuar como modulador funcional de las respuestas condicionadas a la cocaína a través de su regulación de la transmisión glutamatérgica.

---



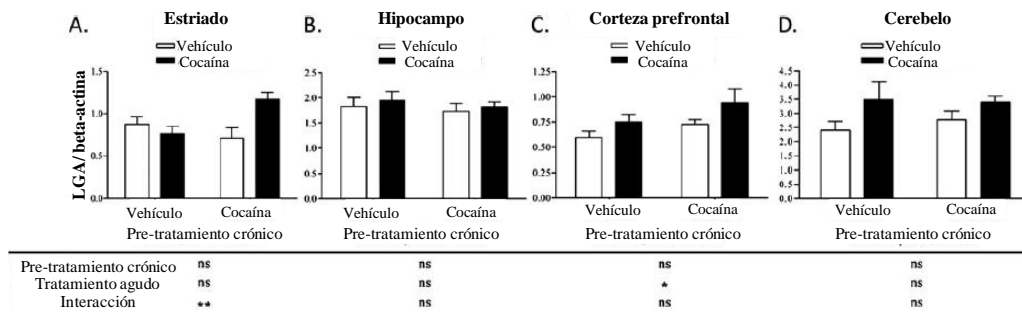
En este sentido, nuestro grupo ha publicado recientemente como parte de las neuroadaptaciones que se producen tras la administración de cocaína implican la regulación de las enzimas de síntesis de glutamato, glutaminasas o GA y el transportador (Blanco, *et al.*, 2011). Empleando un protocolo de sensibilización conductual similar seguido en este estudio, evaluamos el papel de las GA<sub>s</sub> de tipo hepático (en inglés LGA), renal (en inglés, KGA) y el transportador EAAC1 en diferentes momentos del proceso medidos mediante PCR a tiempo real, WB y actividad GA en regiones del sistema de recompensa cerebral.

En primer lugar, nuestros resultados mostraron una reducción de la actividad GA total en el estriado dorsal y la CPF tras cinco días de abstinencia (figura 1A-C).



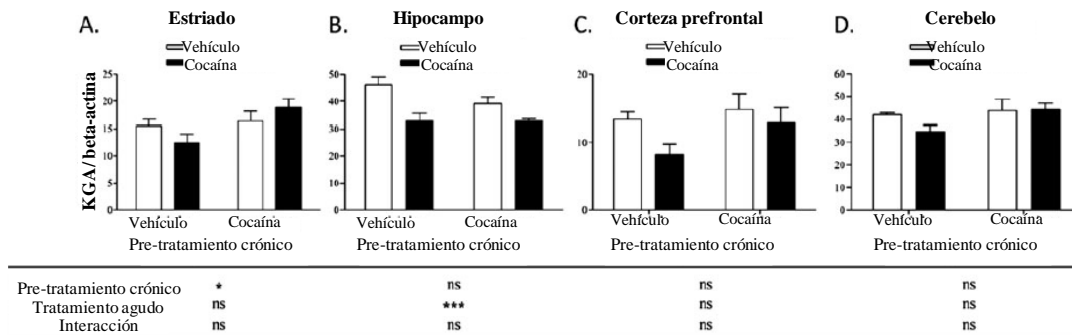
**Figura 1 (A-B-C).** Cuantificación de la actividad enzimática de la glutaminasa.

En segundo lugar observamos incrementos en la expresión de ARNm para LGA en la CPF tras la inyección aguda única de cocaína y tras sensibilización por *priming* en el estriado (figura 2A-D).



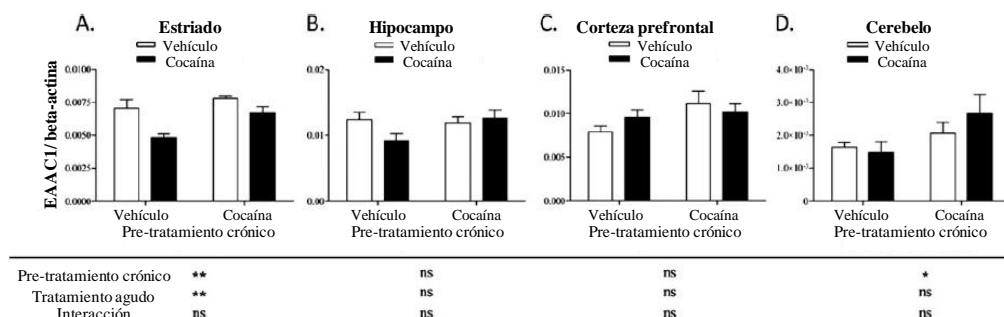
**Figura 2 (A-B-C-D).** Análisis de la expresión del ARNm de la glutaminasa de tipo hepática, normalizados a los niveles de ARNm de  $\beta$ -actina. Cada valor corresponde a los niveles de mRNA en ratones C57BL/6J después de tratamiento agudo.

En tercer lugar, la administración crónica de cocaína produjo nuevo un incremento de KGA en el estriado, mientras que en el hipocampo la inyección aguda única y el *priming* redujeron los niveles de esta enzima (figura 3A-D).



**Figura 3 (A-B-C-D).** Análisis de la expresión del ARNm de la glutaminasa de riñón, normalizados a los niveles de ARNm de  $\beta$ -actina. Cada valor corresponde a los niveles de mRNA en ratones C57BL/6J después de tratamiento agudo.

En último lugar, los niveles del transportador EAAC1 en el estriado se vieron reducidos por el tratamiento agudo y crónico con cocaína, mientras que en el cerebelo se produjo un incremento por el tratamiento crónico (figura 4A-D).



**Figura 4 (A-B-C-D).** Análisis de la expresión del ARNm de la glutaminasa del transportador neuronal de glutamato (EAAC1), normalizados a los niveles de ARNm de  $\beta$ -actina. Cada valor corresponde a los niveles de mRNA en ratones C57BL/6J después de tratamiento agudo.

La disminución de la actividad GA total en estriado y PFC tras el tratamiento crónico con cocaína podría venir explicado por compensación para contrarrestar el incremento que se produce tras la liberación de glutamato o porque la retirada de la exposición repetida a cocaína reduce los niveles extracelulares de este neurotransmisor excitatorio (Schundt y Pierce, 2010). De esta forma, el incremento de ambos Gas (KGA y LGA) a nivel de estriado tras la sensibilización inducida por un priming de cocaína podría indicar una disociación entre los niveles de expresión genómico y proteómico en la regulación al alza cuando se produce una neuroadaptación que implica al glutamato como neurotransmisor principal. Fundamentalmente, el proceso de sensibilización incrementó niveles de ARNm de KGA en estriado y LGA en estriado/PFC, sin afectar a penas a otras estructuras fuera de este sistema. Una excepción a este patrón de cambios lo observamos con una disminución de KGA en hipocampo (figura 3B) tras la inyección aguda de cocaína y alteración en los niveles de transportador EAAC1 en estriado y cerebelo (figura 4A-D). De este modo, la implicación de las enzimas de síntesis de glutamato en las neuroadaptaciones mediadas por cocaína en el circuito estriado-prefrontal deberían ser esenciales para entender el proceso de sensibilización con psicoestimulantes.

---



### CONCLUSIONES ESTUDIO 3.

El ácido lisofosfatídico es un fosfolípido que modula el desarrollo neurológico y la neurogénesis en el hipocampo a través de sus acciones sobre los receptores LPA<sub>1</sub>. Nuevas aportaciones apoyan que LPA<sub>1</sub> sea un mediador del aprendizaje y el comportamiento emocional. No hay estudios sobre su papel en las conductas asociadas al consumo de drogas.

Hemos examinado si la supresión genética del receptor LPA<sub>1</sub> en ratones KO-maLPA<sub>1</sub> afectó a la locomoción o sensibilización conductual inducida por la exposición repetida a cocaína. Asimismo, se analizó si la cocaína induce cambios en la expresión de marcadores funcionales de los dos genes de la dopamina y el glutamato-relacionados con en el cuerpo estriado y el hipocampo dorsal. Los ratones KO-maLPA<sub>1</sub> presentan una respuesta atenuada de LC después del condicionamiento a cocaína, pero una sensibilización normal después de exposición crónica a cocaína.

Los presentes resultados indican que la carencia de receptores LPA<sub>1</sub> afecta a la LC inducida por cocaína, pero no a la sensibilización conductual. Los hallazgos sugieren que los receptores LPA<sub>1</sub> pueden ser necesarios para un normal aprendizaje asociativo contextual asociado a cocaína, probablemente a través de la modulación de circuitos hipocampo-glutamatérgicos.

---





## **VI. CONCLUSIONES GENERALES**

---



Los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral, permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. La estimulación de receptores D2/D3, mediante la administración de un agonista dopaminérgico (quinpirole) produjo en un modelo animal de ratón C57/BL6J una respuesta bifásica consistente en: un descenso acusado de la movilidad seguido de un incremento progresivo de la actividad locomotora (hiperlocomoción).
  2. Este patrón de respuesta comportamental típico de activación dopaminérgica se caracteriza por la exposición de conductas de salto y estereotipias (auto-aseo, alzada y escalada) en el pico máximo del efecto evaluado en el test medición en cilindros (TMC).
  3. La interacción entre el sistema dopaminérgico y endocannabinoide evaluada tras co-administración de quinpirole e inhibidores de enzimas de degradación de FAAH y MAGL produjo una disminución de la actividad locomotora (hiperactividad inducida) y estereotipias.
  4. La co-administración de OEA y cocaína fue capaz de modificar la adquisición, revertir la respuesta de LC y alterar el desarrollo de SC. Además, OEA logró bloquear completamente la expresión de CLP inducido por cocaína.
  5. La supresión del receptor nuclear PPAR $\alpha$  desarrolla un proceso de adquisición, extinción y expresión de la preferencia de lugar condicionada (CLP) con cocaína normal. Después de una inyección con un *priming* de cocaína los animales tuvieron un restablecimiento de la respuesta de preferencia o recuperaron la respuesta de preferencia de lugar inicial.
  6. La respuesta de sensibilización por cocaína está bloqueado por el efecto de la OEA en animales KO-PPAR $\alpha$  probablemente mediada por otras vías de modulación cannabinoide.
-

7. Los resultados obtenidos en el estudio de la LC en animales carentes del receptor LPA<sub>1</sub>, indican que la falta de dicho receptor afecta a la inducida locomoción condicionada por cocaína pero no la sensibilización conductual.
  8. Los resultados sugieren que el receptor LPA<sub>1</sub> puede ser necesario para un aprendizaje asociativo contextual normal asociados a cocaína, probablemente a través de la modulación hipocampal glutamatérgica.
-

## VII. BIBLIOGRAFÍA

---



- Abbott, B.D. (2008). Review of the expression of peroxisome proliferators-activated receptors alpha (PPARalpha), beta (PPARbeta), and gamma (PPARgamma) in rodent and human development. *Reprod Toxicol*, 27, 3-4, 246-57.
- Aceto, M.D., Scates, S.M., Martin, B.R. (2001). Spontaneous and precipitated withdrawal with a synthetic cannabinoid, WIN 55212-2. *European Journal of Pharmacology*. 23, 416, 75-81.
- Adermark, L. y Lovinger, D.M. (2007). Retrograde endocannabinoid signaling at striatal synapses requires a regulated postsynaptic release step. *Proc Natl Acad Sci*, 104, 51, 20564-20569.
- Adermark, L., Talani, G. y Lovinger, D.M. (2009). Endocannabinoid-dependent plasticity at GABAergic and glutamatergic synapses in the striatum is regulated by synaptic activity. *Eur J Neurosci*, 29, 1, 32-41.
- Adewale, A.S., Platt, D.M. y Spealman, R.D. (2006). Pharmacological stimulation of group II metabotropic glutamate receptors reduces cocaine self-administration and cocaine-induced reinstatement of drug seeking in squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther*, 318, 922-931.
- Almasi, R., Szoke, E., Bolcskei, K., Varga, A., Riedl, Z., Sandor, Z., Szolcsányi, J. y Petho, G. (2008). Actions of 3-methyl-N-oleoyldopamine, 4-methyl-N-oleoyldopamine and N-oleylethanolamide on the rat TRPV1 receptor in vitro and in vivo. *Life Sci*, 82, 644-51.
- Alvarez-Jaimes, L.J. y Palmer, J.A. (2011). The Role of Endocannabinoids in Pain modulation and the Therapeutic Potential of Inhibiting their Enzymatic degradation. *Curr Pharm Biotechnol*, 12, 10, 1644-59.
- Ameri, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol*, 58, 315-348.
- Anliker, B. y Chun, J. (2004). Lysophospholipid G protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 279, 20555-20558.
-



- Arnold, J. C., Topple, A.N., Hunt, G.E. y McGregor, I.S. (1998). Effects of pre-exposure and co-administration of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 on behavioral sensitization to cocaine. *European Journal of Pharmacology*, 354, 9-16.
- Arnold, J. C. (2005). The role of endocannabinoid transmission in cocaine addiction. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 81, 396–406.
- Baker, D., Pryce, G., Davies, W.L., Hiley, C.R. (2006). In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci*, 27, 1-4.
- Baptista, M.A., Martin-Fardon, R. y Weiss, F. (2004). Preferential effects of the metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist LY379268 on conditioned reinstatement versus primary reinforcement: comparison between cocaine and a potent conventional reinforcer. *J Neurosci*, 24, 4723–4727.
- Bardo, M. T. Y Bevins, R. A. (2000). Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology*, 153, 31–43.
- Battisti, J.J., Chang, C.H., Uretsky, N. J. y Wallace, L. J. (1999). Sensitization of stereotyped behavior to amphetamine is context and response dependent. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 63, 2, 263–269.
- Baptista, M.A., Martin-Fardon, R. y Weiss, F. (2004). Preferential effects of the metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist LY379268 on conditioned reinstatement versus primary reinforcement: comparison between cocaine and a potent conventional reinforcer. *J Neurosci*, 24, 4723–4727.
- Beltramo, M., di Tomaso, E., & Piomelli, D. (1997). Inhibition of anandamide hydrolysis in rat brain tissue by (E)-6-(bromomethylene) tetrahydro-3-(1-naphthalenyl)-2H-pyran- 2-one. *FEBS Lett*, 403, 263-267.
- Beltramo, M., Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Calignano, A., Gorriti, M. A., Grammatikopoulos, G., Sadile, A. G., Giuffrida, A. and Piomelli, D. (2000). Reversal of Dopamine D2 Receptor Responses by an Anandamide Transport Inhibitor. *The Journal of Neuroscience*, 20, 9, 3401-3407.
- Berger, J.P., Akiyama, T.E. y Meinke, P.T. (2005). PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci*, 26, 244-51.
-

- Berrendero, F. (2002). Elementos que forman parte del Sistema Cannabinoide endógeno. Pp.: 23-33. En: Guía básica sobre cannabinoides. Sociedad Española de investigación sobre cannabinoides. Madrid.
- Bilbao, A., Parkitna, J.R., Engblom, D., Perreau-Lenz, S., Sanchis-Segura, C., Schneider, M., Konopka, W., Westphal, M., Breen, G., Desrivieres, S., Klugmann, M., Guindalini, C., Vallada, H., Laranjeira, R., de Fonseca, F.R., Schumann, G., Schütz, G. y Spanagel, R. (2008) Loss of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase type IV in dopaminoceptive neurons enhances behavioral effects of cocaine. *Proc Natl Acad Sci*, 105, 17549-54.
- Bisogno, T., Ligresti, A. y Di Marzo, V. (2005). The endocannabinoid signalling system: Biochemical aspects. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 81, 224-238.
- Bisogno, T., Cascio, M. G., Saha, B., Mahadevan, A., Urbani, P., Minassi, A., Appendino, G., Saturnino, C., Martin, B., Razdan, R. y Di Marzo, V. (2006). Development of the first potent and specific inhibitors of endocannabinoid biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761, 205–212.
- Bisogno, T. y Di Marzo, V. (2007). Short- and long-term plasticity of the endocannabinoid system in neuropsychiatric and neurological disorders. *Pharmacological Research*, 56, 428–442.
- Blanco, E., Bilbao, A., Luque-Rojas, M.J., Palomino, A., Bermúdez-Silva, F.J., Suárez, J., Santín, L.J., Estivill-Torrús, G., Gutiérrez, A., Campos-Sandoval, J.A., Alonso-Carrión, F.J., Márquez, J. y de Fonseca, F.R. (2012) Attenuation of cocaine-induced conditioned locomotion is associated with altered expression of hippocampal glutamate receptors in mice lacking LPA1 receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, 220, 1, 27-42.
- Bobes, J., Saiz, P. A., González, M. P. y Bascarán, M. T. (2001). Epidemiología del uso/abuso de la cocaína. *Adicciones*, 13, 2, 24-37.
- Bordet, R. Ouk, T., Petrault, O., Gele', P., Gautier, S., Laprais, M., Deplanque, D., Duriez, P., Staels, B., Fruchart, J.C. y Bastide, M. (2006). PPAR: a new
-

- pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative diseases. *Biochemical Society Transactions*, 34, 1341-6.
- Borrelli, F. y Izzo, E.E. (2009). Role of acylethanolamides in the gastrointestinal tract with special reference to food intake and energy balance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 23, 1, 33-49.
- Bossong, M.G., van Berckel, B.N., Boellaard, R., Zuurman, L., *et al.*, (2009). Delta 9-tetrahydrocannabinol induces dopamine release in the human striatum. *Neuropsychopharmacology*, 34, 3, 759-766.
- Bouaboula, M., Poinot-Chazel, C., Bourrie, B., Canat, X., Calandra, B., Rinaldi-Carmona, M., Le Fur, G., Casellas, P. (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem. J*, 312, 637-641.
- Boudreau, A.C., Reimers, J.M., Milovanovic, M. y Wolf, M.E. (2007). Cell surface AMPA receptors in the rat nucleus accumbens increase during cocaine withdrawal but internalize after cocaine challenge in association with altered activation of mitogen-activated protein kinases. *J Neurosci*, 27, 10621–10635.
- Bubin, A.E., Bahnson, T., Weiner, J.A., Fukushima, N., Chun, J. (1999). Lysophosphatidic acid stimulates neurotransmitter-like conductance changes that precede GABA and L-glutamate in early, presumptive cortical neuroblasts. *J Neurosci*, 19, 1371-1381.
- Buck, K., Lischka, T., Dorow, J. y Crabbe, J. (2000). Mapping Quantitative Trait Loci That Regulate Sensitivity and Tolerance to Quinpirole, a Dopamine mimetic Selective for D2/D3 Receptors. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)*, 96, 696–705.
- Brenhouse, H.C., Montalto, S. y Stellar, J.R. (2006). Electrolytic lesions of a discrete area within the nucleus accumbens shell attenuate the long-term expression, but not early phase, of sensitization to cocaine. *Behav Brain Res*, 170, 219-23.
- Breivogel, C.S. y Childers, S.R. (1998). The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis*, 5, 417-31.
-

- Caballero, L. (2005). Adicción a cocaína: Neurobiología, clínica, diagnóstico y tratamiento. Secretaría General de sanidad. Delegación del gobierno para el Plan General Sobre Drogas. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid.
- Campolongo, P., Roozendaal, B., Trezza, V., Cuomo, V., Astarita, G., Fu, J., McGaugh, J.L. y Piomelli, D. (2009). Fat-induced satiety factor oleoylethanolamide enhances memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci*, 106, 8027-31.
- Canales, J.J. y Graybiel, A. M. (2000). A measure of striatal function predicts motor stereotypy. *Nature neuroscience*, 3, 4, 377-383.
- Castilla-Ortega, E., Sanchez-Lopez, J., Hoyo-Becerra, C., Matas-Rico, E., Zambrana-Infantes, E., Chun, J., De Fonseca, F.R., Pedraza, C., Estivill-Torrus, G. y Santin, L.J. (2010). Exploratory, anxiety and spatial memory impairments are dissociated in mice lacking the LPA(1) receptor. *Neurobiol Learn Mem*, 94, 73-82.
- Contos, J.J. y Chun, J. (2000). Genomic characterization of the lysophosphatidic acid receptor gene, *lp(A2)/Edg4*, and identification of a frameshift mutation in a previously characterized cDNA. *Genomics*, 64, 155-69.
- Contos, J.J., Fukushima, N., Weiner, J.A., Kaushal, D. y Chun, J. (2000). Requirement for the LPA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci*, 97, 13384-13389.
- Corominas, M., Roncero, C., Bruguera, E. y Casas, M. (2007). Sistema dopaminérgico y adicciones. *Rev Neurol*, 44, 1, 23-31.
- Chambers, R.A., Sentir, A.M. y Engleman, E.A. (2010) Ventral and dorsal striatal dopamine efflux and behavior in rats with simple vs. comorbid histories of cocaine sensitization and neonatal ventral hippocampal lesions. *Psychopharmacology (Berl)*, 212, 73-83.
- Chefer, V.I. y Shippenberg, T.S. (2002) Changes in basal and cocaine-evoked extracellular dopamine uptake and release in the rat nucleus accumbens during early abstinence from cocaine: quantitative determination under transient conditions. *Neuroscience*, 112, 4, 907-19.
-

- Chiang, M.Y., Misner, D., Kempermann, G., Schikorski, T., Giguere, V., Sucov, H.M., *et al.* (1998). An essential role for retinoid receptors RARbeta and RXRgamma in long-term potentiation and depression. *Neuron*, 21, 1353-61.
- Childers, S.R. y Deadwyler, S.A. (1996). Role of cyclic AMP in the actions of cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 27, 819-27.
- Chun, J. (2005). Lysophospholipids in the nervous system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 77, 46-51.
- Chun, J., Contos, J.J. y Munroe, D. (1999) A growing family of receptor genes for lysophosphatidic acid (LPA) and other lysophospholipids (LPs). *Cell Biochem Biophys*, 30, 213-242.
- Clapper, J.R., Moreno-Sanz, G., Russo, R., Guijarro, A., Vacondio, F., Duranti, A., Tontini, A., Sanchini, S., Sciolino, N.R., Spradley, J.M., Hohmann, A.G., Calignano, A., Mor, M., Tarzia, G. y Piomelli, D. (2010). Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. *Nat Neurosci*, 10, 1265-70.
- Cluny, N.L., Keenan, C.M., Lutz, B., Piomelli, D. y Sharkey, K.A. (2009) The identification of peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent effects of oleoylethanolamide on intestinal transit in mice. *Neurogastroenterol Motil*, 21, 420-9.
- Colombo, G., Serra, S., Vacca, G., Carai, M.A. y Gessa, G.L. (2005). Endocannabinoid system and alcohol addiction: pharmacological studies. *Pharmacol Biochem Behav*, 81, 2, 369-380.
- Coria-Avila, G.A., Pfaus, J.G., Miquel, M., Pacheco, P. y Manzo, J. (2008). Preferencias condicionadas por sexo y drogas: comparación de las bases neurales. *Rev Neurol*, 46, 4, 213-218.
- Cravatt, B.F., Demarest, K., Patricelli, M.P., Bracey, M.H., Giang, D.K., Martin, B.R. y Lichtman, A.H. (2001). Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci*, 98, 16, 9371-9376.
-

- Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., *et al.* (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 384, 6604, 83-87.
- Crunelle, C.L., van de Giessen, E., Schulz, S., Vanderschuren, L.J., de Bruin, K., van den Brink, W. y Booij, J. (2011). Cannabinoid-1 receptor antagonist rimonabant (SR141716) increases striatal dopamine D2 receptor availability. *Addict Biol*, doi: 10.1111/j.1369-1600.2011.00369.x.
- Deplanque, D., Gelé, P., Pétrault, O., Six, I., Furman, C., Bouly, M., Nion, S., Dupuis, B., Leys, D., Fruchart, J.C., Cecchelli, R., Staels, B., Duriez, P. y Bordet R. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  activation as a mechanism of preventive neuroprotection induced by chronic fenofibrate treatment. *J Neurosci*, 23, 15, 6264-71.
- Davis, M.D., Heffner, T.G. y Cooke, L.W. (1997). Dopamine agonist-induced inhibition of neurotransmitter release from the awake squirrel monkey putamen as measured by microdialysis. *J Neurochem*, 68, 2, 659-66.
- Desbonnet, L., Waddington, J.L. y Tuathaigh, C.M. (2009). Mice mutant for genes associated with schizophrenia: common phenotype or distinct endophenotypes? *Behav Brain Res*, 204, 258-273.
- Devane, W.A., Dysarz, F.A., Johnson, M.R., Melvin, L.S., Howlett, A.C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*, 34, 605-613.
- Devane, W. A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., Gibson, D., Mandelbaum, A., Etinger, A. y Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258, 1946-1949.
- De Vries, T.J., Shaham, Y., Homberg, J.R., Crombag, H., Schuurman, K., Dieben, J., Vanderschuren, L.J. y Schoffelmeer, A.N. (2001). A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nat Med*, 7, 10, 1151-1154.
- Di Chiara, G. (2002). Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res*, 137, 1-2, 75-114.
-

- Dillon, G.M., Lubbers, L.S., Ferguson, M.T., Lao, J.Z., Huang, R.R., Xiao, J.C., Fong, T.M., Hale, J.J., Rupprecht, K., Miao, S., Rowe, B.A., Kornecook, T.J., Dodart, J.C. (2011). MK-7128, a novel CB1 receptor inverse agonist, improves scopolamine-induced learning and memory deficits in mice. *Behav Pharmacol*, 22, 91-100.
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C., y Piomelli, D. (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, 372, 686–691.
- DiMarzo, V. y Deutsch, D. (1998). Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiology of Disease*, 5, 386–404.
- Di Marzo, V., Bifulco, M. y De Petrocellis, L. (2004). The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 771-84.
- Eilam, D. y Szechtman, H. (1989). Biphasic effect of D-2 agonist quinpirole on locomotion and movements. *Eur J Pharmacol*, 161, 2-3, 151-7.
- Eilam, D., Golani, I. y Szechtman, H. (1989). D2-agonist quinpirole induces perseveration of routes and hyperactivity but no perseveration of movements. *Brain Research*, 490, 255-267.
- Eilam, D., Talangbayan, H., Canaran, G. y Szechtman H. (1992) Dopaminergic control of locomotion, mouthing, snout contact, and grooming: opposing roles of D1 and D2 receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, 106, 4, 447-54.
- Engblom, D., Bilbao, A., Sanchis-Segura, C., Dahan, L., Perreau-Lenz, S., Balland, B., Parkitna, J.R., Lujan, R., Halbout, B., Mameli, M., Parlato, R., Sprengel, R., Luscher, C., Schutz, G. y Spanagel, R. (2008). Glutamate receptors on dopamine neurons control the persistence of cocaine seeking. *Neuron*, 59, 497–508.
- Escher, P. y Wahli, W. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res*, 448, 121-38.
- Estivill-Torrús, G., Llebreg-Zayas, P., Matas-Rico, E., Santin, L., Pedraza, C., De Diego, I., Del Arco, I., Fernandez-Llebreg, P., Chun, J. y De Fonseca, F.R. (2008).
-

- Absence of LPA1 signaling results in defective cortical development. *Cereb Cortex*, 18, 938-50.
- Fattore, L., Fadda, P. y Fratta, W. (2007). Endocannabinoid regulation of relapse mechanisms. *Pharmacological Research*, 56, 418-427.
- Felder, C. C., Joyce, K. E., Briley, E. M., Mansouri, J., Mackie, K., Blond, O., Lai, Y., Ma, A. L., Mitchell, R. L. (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol. Pharmacol*, 48, 443-450.
- Felder, C.C., Joyce, K.E., Briley, E.M., Glass, M., Mackie, K.P., Fahey, K.J., Cullinan, G.J., Hunden, D.C., Johnson, D.W., Chaney, M.O., Koppel, G.A., Brownstein, M. (1998). LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284, 291-7.
- Fernández-Espejo, E. (2002). Bases neurobiológicas de la drogadicción. *Rev Neurol*, 34, 7, 659-664.
- Fernández-Espejo, E., Ramiro-Fuentes, S. and Rodríguez de Fonseca, F. (2009). The absence of a functional Peroxisome Proliferator-Activated receptor-alpha gene in mice enhances motor sensitizing effects of morphine, but not cocaine. *Neuroscience*, 164, 667-675.
- Fernandez-Espejo, E., Viveros, M.P., Núñez, L., Ellenbroek, B.A., *et al.*, (2009) Role of cannabis and endocannabinoids in the genesis of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*, 206, 4, 531-49.
- Fernández-Ruiz, J., Hernández, M. y Ramos, J.A. (2010). Cannabinoid-Dopamine Interaction in the Pathophysiology and Treatment of CNS Disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 16, 72-91.
- Ferrer, B., Asbrock, N., Kathuria, S., Piomelli, D., *et al.* (2003). Effects of levodopa on endocannabinoid levels in rat basal ganglia: implications for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. *Eur J Neurosci*, 18, 6, 1607-1614.
-



- Ferrer, B., Gorriti, M.A., Palomino, A., Gornemann, I., de Diego, Y., Bermúdez-Silva, F.J., Bilbao, A., Fernández-Espejo, E. Y Rodríguez de Fonseca, F. (2007). Cannabinoid CB1 receptor antagonism markedly increases dopamine receptor-mediated stereotypies. *European Journal of Pharmacology*, 559, 180–183.
- Fu, J., Gaetani, S., Oveisi, F., Lo Verme, J., Serrano, A., Rodríguez de Fonseca, F., *et al.* (2003). Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- $\alpha$ . *Nature*, 425, 90-3.
- Fu, J., Oveisi, F., Gaetani, S., Lin, E. y Piomelli, D. (2005). Oleylethanolamide, an endogenous PPAR- $\alpha$  agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology*, 48, 1147-53.
- Fuchs, R.A., Evans, K.A., Ledford, C.C., Parker, M.P., Case, J.M., Mehta, R.H. y See, R.E. (2005). The role of the dorsomedial prefrontal cortex, basolateral amygdala, and dorsal hippocampus in contextual reinstatement of cocaine seeking in rats. *Neuropsychopharmacology*, 30, 296–309.
- Fisone, G., Lluís, C., Agnati, L. F., Franco, R., Fuxe, K., Moreira, F. A. y Lutz, B. (2008). The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addiction Biology*, 13, 196–212.
- Fride, E. (2002). Endocannabinoids in the central nervous system, an overview. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66, 2-3, 221-33.
- Fukushima, N., Weiner, J.A. y Chun, J. (2000). Lysophosphatidic acid (LPA) is a novel extracellular regulator of cortical neuroblast morphology. *Dev Biol*, 228, 6-18.
- Gaetani, S., Fu, J., Cassano, T., DiPasquale, P., Romano, A., Righetti, L., Cianci, S., Laconca, L., Giannini, E., Scaccianoce, S., Mairesse, J., Cuomo, V. y Piomelli, D. (2010) The fat-induced satiety factor oleylethanolamide suppresses feeding through central release of oxytocin. *J Neurosci*, 30, 8096-101.1.
- Galán-Rodríguez, B., Suárez, J., González-Aparicio, R., Bermúdez-Silva, F.J., Maldonado, R., Robledo, P., Rodríguez de Fonseca, F. and Fernández-Espejo, E. (2009). Oleylethanolamide exerts partial and dose-dependent neuroprotection of substantia nigra dopamine neurons. *Neuropharmacology*, 56, 653-664.
-

- Gamaledin, I., Guranda, M., Goldberg, S.R. y Le Foll, B. (2011) The selective anandamide transport inhibitor VDM11 attenuates reinstatement of nicotine seeking behaviour, but does not affect nicotine intake. *Br J Pharmacol*, 164, 1652-60.
- Gardner, E. L. y Vorel, S. R. (1998). Cannabinoid Transmission and Reward-Related Events. *Neurobiology of Disease*, 5, 502–533.
- Garner, J. P. y Mason, G. J. (2002). Evidence for a relationship between cage stereotypies and behavioural disinhibition in laboratory rodents. *Behavioural Brain Research*, 136, 83-92.
- Gelinas, D.S. y McLaurin, J. (2005). PPAR-alpha expression inversely correlates with inflammatory cytokines IL-1beta and TNF-alpha in aging rats. *Neurochem Res*, 30, 1369-75.
- Gerdeman, G. y Lovinger, D.M. (2001). CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J Neurophysiol*, 85, 1, 468-471.
- Gerdeman, G.L., Schechter, J.B. and French, E.D. (2007). Context-Specific Reversal of Cocaine Sensitization by the CB1 Cannabinoid Receptor Antagonist Rimonabant. *Neuropsychopharmacology*, 1–13.
- Gessa, G.L., Mascia, M.S., Casu, M.A., Carta, G. (1997). Inhibition of hippocampal acetylcholine release by cannabinoids: reversal by SR 141716A. *European Journal of Pharmacology*, 327, R1-2.
- Gil-Verona, J. A., Pastor, J.F., De Paz, F., Barbosa, M., Macías-Fernández, J. A., Maniega, M.A, Rami-González, L. y Cañizares-Alejos, S. (2003). Neurobiología de la adicción a las drogas de abuso. *Rev. Neurol*, 36, 4, 361-365.
- Giuffrida, A., Parsons, L.H., Kerr, T.M., Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Piomelli, D. (1999). Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nature Neuroscience*, 2, 358-363.
- Giuffrida, A. y Piomelli, D. (2000). The endocannabinoid system: a physiological perspective on its role in psychomotor control. *Chemistry and Physics of Lipids*, 108, 151–158.
-

- Giuffrida, A., Leweke, F.M., Gerth, C.W., Schreiber, D., *et al.* (2004). Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with psychotic symptoms. *Neuropsychopharmacology*, 29, 11, 2108-2114.
- Glass, M., Brotchie, J.M. y Maneuf, Y.P. (1997). Modulation of neurotransmission by cannabinoids in the basal ganglia. *Eur J Neurosci*, 9, 2, 199-203.
- Godlewski, G., Offertáler, L., Wagner, J.A. y Kunos, G. (2009). Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 89, 3-4, 105-11.
- González, S., Sagredo, O., Gómez, M. y Ramos, J. A. (2002). Química y metabolismo de los cannabinoides. Pp.: 13-23. En: Guía básica sobre cannabinoides. Sociedad Española de investigación sobre cannabinoides. Madrid.
- González-Yanes, C., Serrano, A., Bermúdez-Silva, F.J., Hernández-Dominguez, M., Páez-Ochoa, M.A., Rodríguez de Fonseca, F. y Sánchez-Margalet, V. (2005). Oleyethanolamide impairs glucose tolerance and inhibits insulin-stimulated glucose uptake in rat adipocytes through p38 and JNK MAPK pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289, E923-9.
- Gorriti, M.A., Ferrer, B., del Arco, I., Bermúdez-Silva, F.J., de Diego, Y., Fernandez-Espejo, E., Navarro, M. y Rodríguez de Fonseca, F. (2005). Acute delta9-tetrahydrocannabinol exposure facilitates quinpirole-induced hyperlocomotion. *Pharmacol Biochem Behav*, 81, 1, 71-77.
- Gorriti, M.A., Rodríguez de Fonseca, F., Navarro, M., Palomo, T. (1999). Chronic (-)-delta9-tetrahydrocannabinol treatment induces sensitization to the psychomotor effects of amphetamine in rats. *Eur J Pharmacol*, 365, 2-3, 133-142.
- Grimm, J.W. y See, R.E. (2000). Dissociation of primary and secondary reward-relevant limbic nuclei in an animal model of relapse. *Neuropsychopharmacology*, 22, 473-479.
- Grotenhermen, F. (2006). Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide. *Cannabinoids*, 1, 1, 10-14.
-

- Guzman, M., Lo Verme, J., Fu, J., Oveisi, F., Blazquez, C. y Piomelli, D. (2004). Oleoylethanolamide stimulates lipolysis by activating the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha). *J Biol Chem*, 279, 27849-54.
- Hampson, R.E. y Deadwyler, S.A. (1998). Role of cannabinoid receptors in memory storage. *Neurobiol Dis*, 5, 474-82.
- Hansen, H.S. (2010). Palmitoylethanolamide and other anandamide congeners. Proposed role in the diseased brain. *Exp Neurol*, 224, 1, 48-55.
- Hagues, G., Costentin, J. y Duterte-Boucher D. (2008). Locomotor effects of morphine or alcohol in mice after a repeated treatment with the cannabinoid agonist HU 210. *Eur J Pharmacol.*, 586, 1-3, 197-204.
- Harrison, S.M., Reavill, C., Brown, G., Brown, J.T., Cluderay, J.E., Crook, B., Davies, C.H., Dawson, L.A., Grau, E., Heidbreder, C., Hemmati, P., Hervieu, G., Howarth, A., Hughes, Z.A., Hunter, A.J., Latcham, J., Pickering, S., Pugh, P., Rogers, D.C., Shilliam, C.S. y Maycox, P.R. (2003). LPA1 receptor-deficient mice have phenotypic changes observed in psychiatric disease. *Mol Cell Neurosci*, 24, 1170–1179.
- Hecht, J.H., Weiner, J.A., Post, S.R. y Chun, J. (1996). Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J Cell Biol*, 135, 1071–1083.
- Hernandez-Rabaza, V., Hontecillas-Prieto, L., Velazquez-Sanchez, C., Ferragud, A., Perez-Villaba, A., Arcusa, A., Barcia, J.A., Trejo, J.L. y Canales, J.J. (2008). The hippocampal dentate gyrus is essential for generating contextual memories of fear and drug-induced reward. *Neurobiol Learn Mem*, 90, 553–559.
- Herrera-Solís, A., Vásquez, K.G. y Prospéro-García, O. (2010). Acute and subchronic administration of anandamide or oleamide increases REM sleep in rats. *Pharmacol Biochem Behav.*, 95, 1, 106-12.
- Hohmann, A.G., Suplita, R.L., Bolton, N.M., Neely, M.H., *et al.* (2005). An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature.*, 435, 7045, 1108-12.
-

- Holmstedt, B.R. (1979). Analysis of drugs and psychoactive phenolic amines. *Psychopharmacol Bull*, 15, 51-2.
- Hotsenpiller, G. y Wolf, M.E. (2002). Conditioned locomotion is not correlated with behavioral sensitization to cocaine: an intra-laboratory multi-sample analysis. *Neuropsychopharmacology*, 27, 924–929.
- Howlett, A. C. (1998). The CB1 Cannabinoid Receptor in the Brain. *Neurobiology of Disease*, 5, 6, 405-416.
- Howlett, A.C. (2002). The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 68-69, 619-31.
- Ishii, I., Fukushima, N., Ye, X. y Chun, J. (2004). Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem*, 73, 321–354.
- Itzhak, Y. y Martin, J.L. (2002). Cocaine-induced conditioned place preference in mice: induction, extinction and reinstatement by related psychostimulants. *Neuropsychopharmacology*, 26, 130-4.
- Kainu, T., Wikstrom, A.C., Gustafsson, J.A. y Peltö-Huikko, M. (1994). Localization of the peroxisome proliferator-activated receptor in the brain. *Neuroreport*, 5, 2481-5.
- Kathuria, S., Gaetani, S., Fegley, D., Valiño, F., *et al.* (2003). Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med*, 9, 1, 76-81.
- Kersten, S., Desvergne, B. y Wahli, W. (2000). Roles of PPARs in health and disease. *Nature*, 405, 421-4.
- Kobilov, T., Hazvi, S. y Dudai, Y. (2007). Role of cortical cannabinoid CB1 receptor in conditioned taste aversion memory. *European Journal of Neuroscience*, 25, 3417–3421.
- Koch, M., Kreutz, S., Böttger, C., Benz, A., Maronde, E., Ghadban, C., Korf, H. W. y Dehghani, F. (2010). Palmitoylethanolamide Protects Dentate Gyrus Granule Cells via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Alpha. *Neurotox Res*, 19, 2, 330-40.
-

- Komorowski, J. y Stepień H. (2007). The role of the endocannabinoid system in the regulation of endocrine function and in the control of energy balance in humans. *Postepy Hig Med Dosw*, 61, 99-105.
- Koob, G. F. y Nestler, E. J. (1997). The neurobiology of drug addiction. *The journal of neuropsychiatry and clinical neuroscience*, 9, 482-497.
- Koob, G. F. y Le Moal, M. (2006). Drug Addiction: Transition from Neuroadaptation to Pathophysiology. En: *Neurobiology of Addiction*. Elsevier Inc.
- Kortleven, C., Fasano, C., Thibault, D., Lacaille, J.C. y Trudeau, L.E. (2011). The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol inhibits long-term potentiation of glutamatergic synapses onto ventral tegmental area dopamine neurons in mice. *European Journal of Neuroscience*, 33, 10, 1751–1760.
- Kourrich, S., Rothwell, P.E., Klug, J.R. y Thomas, M.J. (2007). Cocaine experience controls bidirectional synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *J Neurosci*, 27, 7921–7928.
- Kuribara, H. (1996). Importance of post-drug environmental factors for induction of sensitization to the ambulation-increasing effects of methamphetamine and cocaine in mice. *Psychopharmacology*, 126, 293–300.
- Lafenêtre, P., Chaouloff, F. y Marsicano G. (2007). The endocannabinoid system in the processing of anxiety and fear and how CB1 receptors may modulate fear extinction. *Pharmacol Res*, 56, 5, 367-81.
- Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., Petitet, F., *et al.* (1999). Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science*, 283, 5400, 401-404.
- Lee, C.W., Rivera, R., Gardell, S., Dubin, A.E. y Chun, J. (2006). GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. *J Biol Chem*, 281, 23589–23597.
- Lee, C.W., Rivera, R., Dubin, A.E. y Chun, J. (2007). LPA(4)/GPR23 is a lysophosphatidic acid (LPA) receptor utilizing G(s)-, G(q)/G(i)-mediated calcium signaling and G(12/13)-mediated Rho activation. *J Biol Chem*, 282, 4310–4317.
-

- Lesscher, H.M.B., Hoogveld, E., Burbach, J. P. H., Van Ree, J.M., Gerrits, M. A.F.M. (2005). Endogenous cannabinoids are not involved in cocaine reinforcement and development of cocaine-induced behavioural sensitization. *European Neuropsychopharmacology*, 15, 31–37.
- Li, X., Hoffman, A.F., Peng, X.Q., Lupica, C.R., Gardner, E.L. *et al.* (2009) Attenuation of basal and cocaine-enhanced locomotion and nucleus accumbens dopamine in cannabinoid CB1-receptor-knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 204, 1, 1-11.
- Lizasoain, I., Moro, M. A. y Lorenzo, P. (2001). Cocaína: Aspectos farmacológicos. *Adicciones*, 13, 2, 38-45.
- López-Moreno, J. A., González-Cuevas, G., Moreno, G. y Navarro, M. (2008). The pharmacology of the endocannabinoid system: functional and structural interactions with other neurotransmitter systems and their repercussions in behavioral addiction. *Addiction Biology*, 13, 160–187.
- Lo Verme, J., La Ranab, G., Russo, R., Calignano, A. y Piomelli, D. (2005). The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sciences*, 77, 1685–1698.
- Lo Verme, J., Fu, J., Astarita, G., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A. y Piomelli, D. (2005a) The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol*, 67, 15-9.
- Lo Verme, J., Gaetani, S., Fu, J., Oveisi, F., Burton, K. y Piomelli, D. (2005b). Regulation of food intake by oleoylethanolamide. *Cell Mol Life Sci*, 62, 708-16.
- Luchicchi, A., Lecca, S., Carta, S., Pillolla, G., Muntoni, A. L., Yasar, S., Goldberg, S. R. And Pistis, M. (2010). Effects of fatty acid amide hydrolase inhibition on neuronal responses to nicotine, cocaine and morphine in the nucleus accumbens shell and ventral tegmental area: involvement of PPAR- $\alpha$  nuclear receptors. *Addiction Biology*, 15, 3, 277–288.
- Maldonado, R. y Rodríguez de Fonseca, F. (2002). Cannabinoid Addiction: Behavioral Models and Neural Correlates. *The Journal of Neuroscience*, 22, 9, 3326–3331.
-

- Maldonado, R., Valverde, O. y Berrendero, F. (2006). Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *TRENDS in Neurosciences*, 29, 4, 225-232.
- Maneuf, Y.P., Nash, J.E., Croosman, A.R., Brotchie, J.M. (1996). Activation of the cannabinoid receptor by  $\Delta^9$ -THC reduces GABA uptake in the globus palidus. *Eur J. Pharmacol*, 308, 161-164.
- Mangieri, R. A. y Piomelli, D. (2007). Enhancement of endocannabinoid signaling and the pharmacotherapy of depression. *Pharmacological Research*, 56, 360–366.
- Marcellino, D., Carriba, P., Filip, M., Borgkvist, A., Frankowska, M., Bellido, I., Tanganelli, S. y Müller, C. E. (2008). Antagonistic cannabinoid CB1/dopamine D2 receptor interactions in striatal CB1/D2 heteromers. A combined neurochemical and behavioral analysis. *Neuropharmacology*, 54, 815-823.
- Martín, M., Ledent, C., Parmentier, M., Maldonado, R. y Valverde, O. (2000). Cocaine, but not morphine, induces Conditioned place Preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice. *European Journal of Neuroscience*, 12, 4038-4046.
- Martin, A.B., Fernandez-Espejo, E., Ferrer, B., Gorriti, M.A., *et al.* (2008). Expression and function of CB1 receptor in the rat striatum: localization and effects on D1 and D2 dopamine receptor-mediated motor behaviors. *Neuropsychopharmacology*, 33, 7, 1667-1679.
- Mascia, P., Pistis, M., Justinova, Z., Panlilio, L.V., Luchicchi, A., Lecca, S., Scherma, M., Fratta, W., Fadda, P., Barnes, C., Redhi, G.H., Yasar, S., Le Foll, B., Tanda, G., Piomelli, D., y Goldberg, S.R. (2011). Blockade of nicotine reward and reinstatement by activation of alpha-type peroxisome proliferator-activated receptors. *Biol Psychiatry*. 69, 7, 633-41.
- Matas-Rico, E., Garcia-Diaz, B., Llebreg-Zayas, P., Lopez-Barroso, D., Santin, L., Pedraza, C., Smith-Fernandez, A., Fernandez-Llebreg, P., Tellez, T., Redondo, M., Chun, J., De Fonseca, F.R. y Estivill-Torrus G (2008). Deletion of lysophosphatidic acid receptor LPA1 reduces neurogenesis in the mouse dentate gyrus. *Mol Cell Neurosci*, 39, 342–355.
-



- Mattson, B.J. Koya, E., Simmons, D.E., Mitchell, T.B., Berkow, A., Crombag, H. S. and Hope, B. T. (2008). Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. *European Journal of Neuroscience*, 27, 202–212.
- Mazzola, C., Medalie, J., Scherma, M., Panlilio, L.V., Solinas, M., Tanda, G., Drago, F., Cadet, J.L., Goldberg, S.R. y Yasar, S. (2009). Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR-alpha nuclear receptors. *Learn Mem.* 16, 5, 332-7.
- McGinty, J.F. (1999). Regulation of neurotransmitter interactions in the ventral striatum. *Ann N Y Acad Sci*, 877, 129-39.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., Pertwee, R.G., Griffin, G., Bayewitch, M., Barg, J. and Vogel, Z. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50, 83-90.
- Melis, M., Pillolla, G., Luchicchi, A., Muntoni, A.L., Yasar, S., Goldberg, S.R. y Pistis, M. (2008). Endogenous fatty acid ethanolamides suppress nicotine-induced activation of mesolimbic dopamine neurons through nuclear receptors. *The Journal of Neuroscience*, 28, 51, 13985–13994.
- Melis, M., Carta, S., Fattore, L., Tolu, S., Yasar, S., Goldberg, S.R., Fratta, W., Maskos, U. y Pistis M. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha modulate dopamine cell activity through nicotinic receptors. *Biol Psychiatry*, 68, 256-64.
- Meyer, M. E., Potter, T.J. y Van Hartesveldt, C. (1992). Differential effects of dopamine D2 agonist quinpirole upon the dorsal immobility response in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 42, 2, 257-9.
- Meyers, R.A., Zavala, A.R. y Neisewander, J.L. (2003) Dorsal, but not ventral, hippocampal lesions disrupt cocaine place conditioning. *Neuroreport*, 14, 2127–2131.
-

- Meyers, R.A., Zavala, A.R., Speer, C.M. y Neisewander, J.L. (2006). Dorsal hippocampus inhibition disrupts acquisition and expression, but not consolidation, of cocaine conditioned place preference. *Behav Neurosci*, 120, 401–412.
- Mohn, A.R., Yao, W.D. y Caron, M.G. (2004). Genetic and genomic approaches to reward and addiction. *Neuropharmacology*, 47, 101–110.
- Moolenaar, W.H. (1999). Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp Cell Res*, 253, 230-238.
- Moolenaar, W.H., van Meeteren, L.A. y Giepmans, B.N. (2004). The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays*, 26, 870–881.
- Moreno, M., López-Moreno, J. A., Rodríguez de Fonseca, F. and Navarro, M. (2005). Behavioural effects of quinpirole following withdrawal of chronic treatment with the CB1 agonist, HU-210, in rats. *Behavioural Pharmacology*, 16:441–446.
- Moreno, S., Farioli-Vecchioli, S. y Ceru, M.P. (2004). Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*, 123, 131-45.
- Moreira, F.A. y Lutz, B. (2008). The endocannabinoid system: emotion, learning and addiction. *Addict Biol*, 13, 2, 196-212.
- Morishima, Y., Miyakawa, T., Furuyashiki, T., Tanaka, Y., Mizuma, H. y Nakanishi, S. (2005). Enhanced cocaine responsiveness and impaired motor coordination in metabotropic glutamate receptor subtype 2 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci*, 102, 4170–4175.
- Mueller, G. P. y Driscoll, W. J. (2009). Biosynthesis of Oleamide. *Vitamins & Hormones*, 81, 55-78.
- Mutoh, T. y Chun, J. (2008). Lysophospholipid activation of G protein-coupled receptors. *Subcell Biochem*, 49, 269–297.
- Murillo-Rodríguez, E., Palomero-Rivero, M., Millán-Aldaco, D., Arias-Carrión, O. y Drucker-Colín, R. (2011) Administration of URB597, oleoylethanolamide or palmitoylethanolamide increases waking and dopamine in rats. *PLoS One*, 6, 7, :e20766.
-

- Nakatsuka, T., Chen, H.X., Roper, S.N., Gu, J.G. (2003). Cannabinoid receptor-1 activation suppresses inhibitory synaptic activity in human dentate gyrus. *Neuropharmacology*, 45, 116-21.
- Navarro, M. y Rodríguez de Fonseca, F. (1998). The neurobiology of cannabinoid transmission: from anandamide signaling to higher cerebral functions and disease. *Neurobiol Dis*, 5, 379-85.
- Navarro, G., Carriba, P., Gandía, J., Ciruela, F., et al. (2008) Detection of heteromers formed by cannabinoid CB1, dopamine D2, and adenosine A2A G-protein-coupled receptors by combining bimolecular fluorescence complementation and bioluminescence energy transfer. *Scientific World Journal*, 8, 1088-97.
- Ng Cheong Ton, J.M., Gerhardt, G.A., Friedemann, M., Etgen, A.M., *et al.* (1988). The effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on potassium-evoked release of dopamine in the rat caudate nucleus: an in vivo electrochemical and in vivo microdialysis study. *Brain Res*, 451, 1-2, 59-68.
- Noguchi, K., Herr, D., Mutoh, T. y Chun, J. (2009) Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Curr Opin Pharmacol*, 9, 15–23.
- O'Neill, C., Evers-Donnelly, A., Nicholson, D., O'Boyle, K.M., *et al.* (2009). D2 receptor-mediated inhibition of dopamine release in the rat striatum in vitro is modulated by CB1 receptors: studies using fast cyclic voltammetry. *J Neurochem*, 108, 3, 545-551.
- Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Gong, J. P., Patel, S., Meozzi, P. A., Myers, L., Perchuk, A., Mora, A., Tagliaferro, P. A., Gardner, E., Alicia Brusco<sup>4</sup>, Akinshola, E. B., Hope, B., Lujilde, J., Inada, T., Iwasaki, S., Macharia, D., Teasensfitz, L., Arinami, T. Uhl, G. R. (2008). Brain Neuronal CB2 Cannabinoid Receptors in Drug Abuse and Depression: From Mice to Human Subjects. *Plos One*, 3, 2.
- O'Sullivan, S.E. (2007). Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol*, 152, 576-82.
- Overton, H.A., Babbs, A.J., Doel, S.M., Fyfe, M.C., Gardner, L.S., Griffin, G., Jackson, H.C., Procter, M.J., Rasamison, C.M., Tang-Christensen, M., Widdowson, P.S., Williams, G.M. y Reynet, C. (2006). Deorphanization of a G
-

- protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab*, 3, 167-75.
- Panlilio, L.V., Justinova, Z. y Goldberg, S.R. (2010) Animal models of cannabinoid reward. *Br J Pharmacol*, 160, 499-510.
- Paxinos, G. y Franklin, K.B.J. (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 2nd edn. Academic, San Diego.
- Pazos, A. y Mato, S. (2002). Farmacología de los receptores para cannabinoides. Pp.: 33-43. En: *Guía básica sobre cannabinoides*. Sociedad Española de investigación sobre cannabinoides. Madrid.
- Pazos, A., Núñez, E., Benito, C., Tolón, R. M. y Romero, J. (2005). Functional neuroanatomy of the endocannabinoid system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 81, 239 – 247.
- Pertwee, R.G. (1997). Pharmacology of cannabinoids CB1 and CB2 receptors. *Pharmacology and Therapeutics*, 74, 129-180.
- Pertwee, R. G. y Ross, R. A. (2002). Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 66, 2-3, 101-21.
- Pertwee, G. (2005). The Therapeutic Potential of Drugs That Target Cannabinoid Receptors or Modulate the Tissue Levels or Actions of Endocannabinoids. *The AAPS Journal*, 2005; 7, 625-654.
- Peters, J. y Kalivas, P.W. (2006). The group II metabotropic glutamate receptor agonist, LY379268, inhibits both cocaine- and food-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 186, 143–149.
- Petersen, G., Pedersen, A.H., Pickering, D.S., Begtrup, M. y Hansen, H.S. (2009). Effect of synthetic and natural phospholipids on N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D activity. *Chem Phys Lipids*, 162, 1-2, 53-61.
- Pierce, R.C. y Kalivas, P.W. (1997). A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev*, 25, 192-216.
-

- Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature*, 4, 873-884.
- Piomelli, D., Tarzia, G., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Compton, T.R., Dasse, O., Monaghan, E.P., Parrott, J.E. y Putman, D. (2006). Pharmacological Profile of the Selective FAAH Inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Reviews*, 12, 1, 21–38.
- Placzek, E.A., Okamoto, Y., Ueda, N., Barker, E.L. (2008). Membrane microdomains and metabolic pathways that define anandamide and 2-arachidonyl glycerol biosynthesis and breakdown. *Neuropharmacology*, 55, 7, 1095-1104.
- Plaza-Zabala, A., Berrendero, F., Suárez, J., Bermúdez-Silva, F. J., Fernández-Espejo, E., Serrano, A., Pavón, F.J., Parsons, L.H., Rodríguez de Fonseca, F., Maldonado, R. and Robledo, P. (2010). Effects of the Endogenous PPAR-  $\alpha$  Agonist, Oleoylethanolamide on MDMA-Induced Cognitive Deficits in Mice. *Synapse*, 64, 379–389.
- Pontieri, F.E., Monnazzi, P., Scontrini, A., Buttarelli, F.R., Patacchioli, F.R. (2001). Behavioral sensitization to heroin by cannabinoid pretreatment in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 421, 1-3.
- Post, R.M., Weiss, S.R., Fontana, D. y Pert, A. (1992). Conditioned sensitization to the psychomotor stimulant cocaine. *Ann N Y Acad Sci*, 654, 386-99.
- Postma, F.R., Jalink, K., Hengeveld, T., Bot, A.G., Alblas, J. (1996). Serum-induced membrane depolarisation in quiescent fibroblast: activation of a chloride conductance through the G protein-coupled Lpa receptor. *EMBO J*, 15, 63-72.
- Postma, F.R., Jalink, K., Hengeveld, T., Offermanns, S. y Moolenaar, W.H. (2001). G $\alpha$  mediates activation of a depolarising chloride current that accompanies RhoA activation in both neuronal and nonneuronal cells. *Curr Biol*, 11, 121-124.
- Price, D.A., Owens, W.A., Gould, G.G., Frazer, A., Roberts, J.L., Daws, L.C. y Giuffrida, A. (2007). CB1-independent inhibition of dopamine transporter activity by cannabinoids in mouse dorsal striatum. *J Neurochem*, 101, 2, 389-96.
- Ramakers, G.J. y Moolenaar, W.H. (1998). Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Exp Cell Res*, 245, 252-262.
-

- Ramsey, A.J., Laakso, A., Cyr, M., Sotnikova, T.D., Salahpour, A., Medvedev, I.O., Dykstra, L.A., Gainetdinov, R.R. y Caron, M.G. (2008). Genetic NMDA receptor deficiency disrupts acute and chronic effects of cocaine but not amphetamine. *Neuropsychopharmacology*, 33, 2701–2714.
- Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Heaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Marsani, J., Neliat, G., Caput, D., Ferrara, P., Soubrie, P., Breliere, J.C., Le Fur, G. (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Letters*, 350, 240-4.
- Roberts, A. y Koob, G. F. (1997). Neurobiology of addiction. *Alcohol health & research world*, 21, 2, 101-106.
- Roberts, C., Winter, P., Shilliam, C.S., Hughes, Z.A., Langmead, C., Maycox, P.R. y Dawson, L.A. (2005). Neurochemical changes in LPA1 receptor deficient mice, a putative model of schizophrenia. *Neurochem Res*, 30, 371–377.
- Rodríguez-Borrero, E., Bernardo Colón, A., Burgos-Mártir, M.A., Alvarez-Carillo, J.E., del Campo, Y.E., Abella-Ramírez, C. y Maldonado-Vlaar, C.S. (2006). NMDA antagonist AP-5 increase environmentally induced cocaine-conditioned locomotion within the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav*, 85, 178–184.
- Rodríguez de Fonseca, F., Martín-Calderón, J.L., Mechoulam, R., Navarro, M. (1994). Repeated stimulation of D1 dopamine receptors enhances (-)- 11- hydroxy- $\Delta^8$ -tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl- induced catalepsy in male rats. *Neuroreport*, 5, 761-765.
- Rodríguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Martín-Calderón, J. L., Gorriti, M. A., Navarro, M. (1998). Role of the Endogenous Cannabinoid System in the Regulation of Motor Activity. *Neurobiology of Disease*, 5, 483–501.
- Rodriguez de Fonseca, F., Navarro, M., Gomez, R., Escuredo, L., Nava, F., Fu, J., *et al.* (2001). An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*, 414, 209-12.
- Rodríguez De Fonseca, F., Gorriti, M.A., Bilbao, A., Escuredo, L., García-Segura, L.M., Piomelli, D. y Navarro, M. (2001). Role of the endogenous cannabinoid
-

system as a modulator of dopamine transmission: implications for Parkinson's disease and schizophrenia. *Neurotox Res.*, 3, 1, 23-35.

Rodríguez de Fonseca, F. (2003). Participación del sistema límbico en la neurobiología de la adicción. En: Aspectos básicos y clínicos sobre la neurobiología de la adicción. Fundación Dr. Antonio Esteve. Barcelona.

Rodríguez de Fonseca, F. (2004). Sistema endocannabinoide y control de la ingesta. *Rev Med Univ Navarra*, 48, 2, 18-23.

Rodríguez de Fonseca, F., Del, A., I, Bermúdez-Silva, F. J., Bilbao, A., Cippitelli, A., Navarro, M. (2005). The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol & Alcohol*, 40, 2-14.

Roncero, J., Ramos, J. A., Collazos, F. y Casas, M. (2001). Complicaciones psicóticas del consumo de cocaína. *Adicciones*, 13, 2, 179-190.

Ropero, A.B., Juan-Picó, P., Rafacho, A., Fuentes, E., Bermúdez-Silva, F.J., Roche, E., Quesada, I., de Fonseca, F.R. y Nadal, A. (2009) Rapid non-genomic regulation of Ca<sup>2+</sup> signals and insulin secretion by PPAR alpha ligands in mouse pancreatic islets of Langerhans. *J Endocrinol*, 200, 127-38.

Roux, S., Froger, C., Porsolt, R.D., Valverde, O. y Maldonado, R. (2003). Place preference test in rodents. *Curr Protoc Neurosci*, 9, Unit 9 15.

Santín, L.J., Bilbao, A., Pedraza, C., Matas-Rico, E., López-Barroso, D., Castilla-Ortega, E., Sánchez-López, J., Riquelme, R., Varela-Nieto, I., de la Villa, P., Suardiaz, M., Chun, J., De Fonseca, F.R. y Estivill-Torrús, G. (2009). Behavioral phenotype of maLPA1-null mice: increased anxiety-like behavior and spatial memory deficits. *Genes Brain Behav*, 8, 772–784.

Shaldubina, A., Einat, H., Szechtman, H., Shimon, H. y Belmaker, R.H. (2002). Preliminary evaluation of oral anticonvulsant treatment in the quinpirole model of bipolar disorder. *J Neural Transm*, 109, 3, 433-40.

Schenk, S. y Partridge, B. (1997). Sensitization and tolerance in psychostimulant self-administration. *Pharmacol Biochem Behav*, 57, 543-50.

- Scherma, M., Fadda, P., Le Foll, B., Forget, B., *et al.* (2008). The endocannabinoid system: a new molecular target for the treatment of tobacco addiction. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 7, 5, 468-481.
- Scherma, M., Justinová, Z., Zanettini, C., Panlilio, L.V., Mascia, P., Fadda, P., Fratta, W., Makriyannis, A., Vadivel, S.K., Gamaledin, I., Le Foll, B. y Goldberg, S.R. (2011) The anandamide transport inhibitor AM404 reduces the rewarding effects of nicotine and nicotine-induced dopamine elevations in the nucleus accumbens shell in rats. *Br J Pharmacol*, 165, 8, 2539-2548.
- Schlussman, S. D., Zhang, Y., Kane, S., Stewart, C. L., Ho, A., Kree, M.J. (2005). Locomotion, stereotypy, and dopamine D1 receptors after chronic “binge” cocaine in C57BL/6J and 129/J mice. *Pharmacology, biochemistry and Behavior*, 75, 123–131.
- Serrano, A., Pavón, F.J., Tovar, S., Casanueva, F., Señarís, R., Diéguez, C. y de Fonseca, F.R.(2011) Oleoylethanolamide: effects on hypothalamic transmitters and gut peptides regulating food intake. *Neuropharmacology*, 60, 593-601.
- Solinas, M., Justinova, Z., Goldberg, S.R. y Tanda, G. (2006). Anandamide administration alone and after inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) - increases dopamine levels in the nucleus accumbens shell in rats. *Journal of Neurochemistry*, 98, 408–419.
- Solinas, M., Yasar, S. y Goldberg, S. R. (2007). Endocannabinoid system involvement in brain reward processes related to drug abuse. *Pharmacological Research*, 56, 393–405.
- Solinas, M., Goldberg, S. R. y Piomelli, D. (2008). The endocannabinoid system in brain reward processes. *British Journal of Pharmacology*, 154, 369–383.
- Stone, V.M., Dhayal, S., Smith, D.M., Lenaghan, C., Brocklehurst, K.J. y Morgan, N.G. (2011) The cytoprotective effects of oleoylethanolamide in insulin-secreting cells do not require activation of GPR119. *Br J Pharmacol*, 165, 8, 2758-70.
- Suardíaz, M., Estivill-Torrús, G., Goicoechea, C., Bilbao, A. y Rodríguez de Fonseca, F. (2007). Analgesic properties of oleoylethanolamide (OEA) in visceral and inflammatory pain. *Pain*, 133, 99-110.
-



- Sun, Y., Alexander, S.P., Garle, M.J., Gibson, C.L., Hewitt, K., Murphy, S.P., *et al.* (2007). Cannabinoid activation of PPAR  $\alpha$ ; a novel neuroprotective mechanism. *Br J Pharmacol*, 152, 734-43.
- Sullivan, R., Dogaru, C. y Szechtman, H. (1992). Constriction of Environmental Space and the Behavioral Response to the Dopamine Agonist Quinpirole. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 43, 1217-1219.
- Sugiura, T. y Waku, K. (2002). Cannabinoid receptors and their endogenous ligands. *Biochem J.*; 132, 7-12.
- Skonberg, C., Artmann, A., Cornett, C., Hansen, S.H. y Hansen, H.S. (2010). Pitfalls in the sample preparation and analysis of N-acylethanolamines. *J Lipid Res*, 10, 3062-73.
- Skrinskaya, J. A., Nikulina, E. M. y Popova, N. K. (1992). Role of Genotype in Brain Dopamine Metabolism and Dopamine-Dependent Behavior of Mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 42, 261-261.
- Steketee, J. D. (2003). Neurotransmitter systems in the medial prefrontal cortex: potential role in sensitization to psychostimulants. *Brain Res Rev*, 41, 203–28.
- Steketee, J. D. (2005). Cortical Mechanisms of Cocaine Sensitization. *Critical Reviews in Neurobiology*, 17, 2, 69-86.
- Stella, N., Schweitzer, P. y Piomelli, D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388, 6644, 773-778.
- Szumliński, K. K. y Szechtman, H. (2002). D2 receptor blockade in the dorsal raphe increases quinpirole-induced locomotor excitation. *Neurophysiology, basic and clinical*, 13, 5, 563-566.
- Tan, N.S., Michalik, L., Desvergne, B. y Wahli, W. (2005). Multiple expression control mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptors and their target genes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 93, 99-105.
- Tanda, G. (2007). Modulation of the endocannabinoid system: Therapeutic potential against cocaine dependence. *Pharmacological Research*, 56, 406–417.
-

- Tien, E.S., Hannon, D.B., Thompson, J.T. y Vanden Heuvel, J.P. (2006). Examination of Ligand-Dependent Coactivator Recruitment by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha (PPARalpha). *PPAR Res*, 2006-69612.
- Tigyi G. y Miledi, R. (1992). Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *J Biol Chem*, 267, 21360- 21367.
- Tirelli, E., Tambour, S. y Michel, A. (2003). Sensitised locomotion does not predict conditioned locomotion in cocaine-treated mice: further evidence against the excitatory conditioning model of context-dependent sensitisation. *Eur Neuropsychopharmacol*, 13, 289–296.
- Touriño, C., Oveisi, F., Lockney, J., Piomelli, D. y Maldonado, R. (2010). FAAH deficiency promotes energy storage and enhances the motivation for food. *Int J Obes*, 34, 3, 557-68.
- Tropea, T.F., Kosofsky, B.E. y Rajadhyaksha, A.M. (2008). Enhanced CREB and DARPP-32 phosphorylation in the nucleus accumbens and CREB, ERK, and GluR1 phosphorylation in the dorsal hippocampus is associated with cocaine-conditioned place preference behavior. *J Neurochem*, 106, 1780–1790.
- Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M.C., Mackie, K., y Walker, J.M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neurosci*, 83, 393-411.
- Tzschentke, T.M. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol*, 12, 227-462.
- Usiello, A., Baik, J.H., Rougé-Pont, F., Picetti, R., Dierich, A., LeMeur, M., Piazza, P.V. y Borrelli, E. (2000). Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature*, 408, 6809, 199-203.
- Vanderschuren, L.J.M.J. y Kalivas, P. (2000). Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology*, 151, 2-3, 99-120.
-

- Van Hartesveldt, C.; Cottrell, G. A.; Potter, T.; Meyer, M. E. Effects of intracerebral quinpirole on locomotion in rats. *Eur. J. Pharmacol.* (En prensa).
- Van Hartesveldt, C., Meyer, M.E. y Potter, T.J. (1994). Ontogeny of biphasic locomotor effects of quinpirole. *Pharmacol Biochem Behav*, 48, 3, 781-6.
- Van Hartesveldt, C. (1997). Temporal and environmental effects on quinpirole-induced biphasic locomotion in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 58, 4, 955-60.
- Vigano, D., Valenti, M., Cascio, M.G., Di Marzo, V., Parolaro, D. y Rubino, T. (2004). Changes in endocannabinoid levels in a rat model of behavioural sensitization to Morphine. *Eur J Neurosci*, 20, 1849–1857.
- Viscomi, M. T., Oddi, S., Latini, L., Pasquariello, N., Florenzano, F., Bernardi, G., Molinari, M. and Maccarrone, M. (2009). Selective CB2 Receptor Agonism Protects Central Neurons from Remote Axotomy-Induced Apoptosis through the PI3K/Akt Pathway. *The Journal of Neuroscience*, 29, 14: 4564-4570.
- Viveros, M. P., Marco, E. M. y File, S. E. (2005). Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 81, 331-342.
- Vlachou S, Nomikos GG, Panagis G. (2003). WIN 55,212-2 decreases the reinforcing actions of cocaine through CB1 cannabinoid receptor stimulation. *Behav Brain Res*, 141, 2, 215-22.
- Vlachou, S., Stamatopoulou, F., Nomikos, G.G. y Panagis, G. (2008). Enhancement of endocannabinoid neurotransmission through CB1 cannabinoid receptors counteracts the reinforcing and psychostimulant effects of cocaine. *Int J Neuropsychopharmacol*, 11, 7, 905-23.
- Vorel, S.R., Liu, X., Hayes, R.J., Spector, J.A. y Gardner, E.L. (2001). Relapse to cocaine-seeking after hippocampal theta burst stimulation. *Science*, 292, 1175–1178.
- Walter, L., Franklin, A., Witting, A., Moller, T. y Stella, N. (2002). Astrocytes in culture produce anandamide and other acylethanolamides. *J Biol Chem*, 277, 23, 20869-76.
-

- Wegener, N., Kuhnert, S., Thüns, A., Roese, R. y Koch, M. (2008). Effects of acute systemic and intra-cerebral stimulation of cannabinoid receptors on sensorimotor gating, locomotion and spatial memory in rats. *Psychopharmacology*, 198, 3, 375-85.
- Wiskerke, J., Pattij, T., Schoffelmeer, A.N.M., De Vries, T.J. (2008). The role of CB1 receptors in psychostimulant addiction. *Addiction Biology*, 13, 225–238.
- Yeghiayan, E. A. y Kelley, A. E. (1995). Serotonergic Stimulation of the Ventrolateral Striatum Induces Orofacial Stereotypy. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52, 3, 493-501.
- Xi, Z.X., Ramamoorthy, S., Baker, D.A., Shen, H., Samuvel, D.J. y Kalivas, P.W. (2002). Modulation of group II metabotropic glutamate receptor signaling by chronic cocaine. *J Pharmacol Exp Ther*, 303, 608–615.
- Zhang, G., Contos, J.J., Weiner, J.A., Fukushima, N. y Chun, J. (1999). Comparative analysis of three murine G-protein coupled receptors activated by sphingosine-1-phosphate. *Gene*, 227, 89–99.
- Zweifel, L.S., Argilli, E., Bonci, A. y Palmiter, R.D. (2008). Role of NMDA receptors in dopamine neurons for plasticity and addictive behaviors. *Neuron*, 59, 486–496.
-



**ANEXOS**

---

---



